

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Keemia Instituut
Analüütilise keemia õppetool

Kerli Martin

Süntetiliste retseptorite seondumisskaalade koostamine lihtsamatele karboksülaatsioonidele

Magistritöö

Juhendajad:
Kristjan Haav (MSc)
Prof. Ivo Leito

TARTU 2014

SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1. SUPRAMOLEKULAARNE KEEMIA	5
1.2. MITTEKOVALENTSED VASTASMÕJUD	7
1.3. RETSEPTORMOLEKULIDE DISAIN	8
1.3.1 Anioone siduvad retseptorid	9
1.4. KARBOKSÜLAATIOONID	11
1.5. SOLVENDI ROLL ANIOONIDE SEONDUMISEL RETSEPTORITEGA.....	12
1.6. SEONDUMISKONSTANDID.....	13
1.6.1 Retseptor-anioon komplekside seondumiskonstandid	13
1.6.2 Seondumiskonstantide mõõtmine.....	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
2.1. APARATUUR JA TÖÖVAHENDID	19
2.1.1 UV-Vis spektrofotomeeter.....	19
2.1.2 Tuumamagnetresonants-spektromeeter.....	19
2.1.3 Teised kasutatud töövahendid.....	19
2.2. KASUTATUD KEMIKAALID	20
2.2.1 Solvent	20
2.2.2 Uuritud retseptorid.....	21
2.2.3 Uuritud karboksülaatioonid.....	22
2.3. RETSEPTORITE SUHTELISTE AFIINSUSTE UURIMINE	22
2.3.1 UV-Vis spektrofotomeetriline tiitrimine.....	22
2.3.2 Tuumamagnetresonants-spektromeetriline tiitrimine.....	23
2.4. INDOLOKARBASOOLI ABSOLUUTSETE AFIINSUSTE MÄÄRAMINE	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	26
3.1. RETSEPTORMOLEKULIDE AFIINSUSTE SKAALADE KOOSTAMINE	26
3.2. INDOLOKARBASOOLI ABSOLUUTSE SEONDUMISE MÕÕTMINE	29
3.3. ABSOLUUTSETE $\log K_{\text{ASS}}$ VÄÄRTUSTE MÄÄRAMATUSE HINNANGUD.....	29
3.4. UURITUD RETSEPTORITE AFIINSUSTE VÕRDLEMINE	30
3.4.1 Asendusrühmade mõju afiinsustele.....	30
3.4.2 Retseptorite afiinsus erinevate karboksülaatioonide suhtes	31
3.5. KASUTATUD MEETODI EELISED JA RAKENDATAVUS	34
KOKKUVÕTE	35
SUMMARY.....	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
LISAD.....	40

Kasutatud lühendid

a	aktiivsus
α	dissotsiatsioonimäär
A	neelduvus
A^-	anioon
β	assotsiatsioonimäär
Bu	butüül
c	konsentratsioon
ϵ	molaarne neeldumistegur
K_{ass}	assotsiatsioonikonstant, seondumiskonstant
$\log K_{\text{ass}}$	assotsiatsioonikonstandi logaritm
DNA	desoksüribonukleinhape
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DMSO- d_6	deutereeritud dimetüülsulfoksiid
RH	retseptor
RHA^-	retseptor-anioon kompleks
s	standardhälve
TBA	tetrabutüülammoonium
TMR	tuumamagnetresonants
u	mõõtemääramatus
UV	ultraviolet
Vis	nähtav

Sissejuhatus

Huvipakkuvatele substraatidele sünteetiliste retseptorite arendamine on üheks peamiseks uurimisvaldkonnaks supramolekulaarses keemias. Tänapäevaks on kirjeldatud väga erinevate omadustega selektiivseid retseptoreid nii lihtsatele metallikatioonidele kui ka keerukatele multifunktsionaalsetele molekulidele nagu peptiidid, valgud ja süsivesikud. Bioloogilistes ja sünteetilistes orgaanilistes molekulides on laialdaselt esinevaks funktsionaalseks rühmaks karboksüülrühm, mistõttu on arendatud mitmeid erinevaid meetodeid karboksüülaatioonide detekteerimiseks.

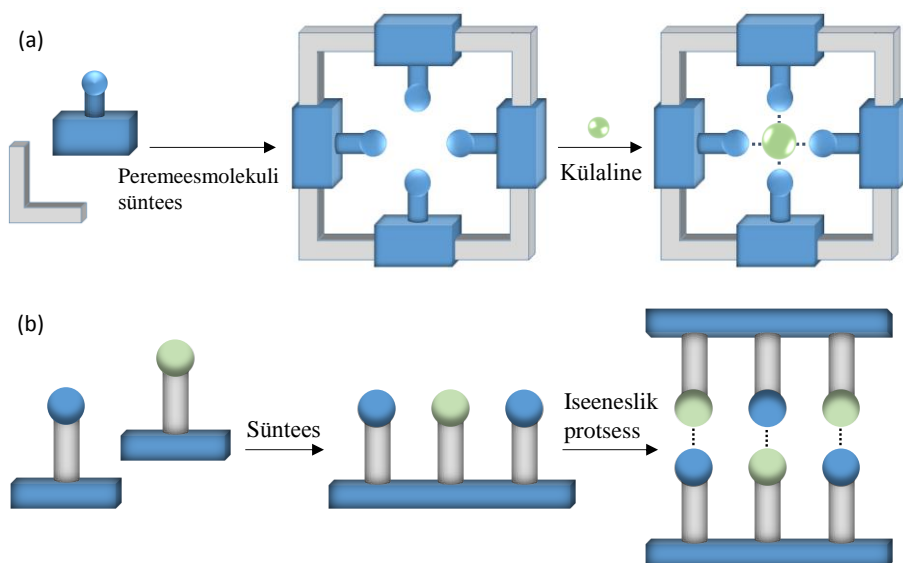
Sünteetilise retseptori afiinsust, samuti tundlikkust määratava aniooni suhtes iseloomustab kvantitatiivselt seondumis- ehk assotsiatsioonikonstant (K_{ass} või $\log K_{\text{ass}}$). Selektiivsust saab hinnata seondumiskonstantide suhte abil, kasutades sama retseptori afiinsuseid erinevate anioonide suhtes. Retseptorit, mis on tundlik ja selektiivne kindla karboksülaatiooni suhtes, saab kasutada näiteks ioonselektiivsete elektroodide valmistamiseks, analüütiliste lahutusmeetodite arendamiseks, tööstusliku ekstraheerimise lihtsustamiseks või hoopiski karboksülaatioonide transporterina bioloogilistes süsteemides.

Käesolevas töös uuritakse trimetüülatsetaat-, bensoaat- ja laktaatiooni seondumist erinevatele lihtsatele sünteetilistele retseptoritele. Seondumisasiinsused määratakse suhtelise mõõtmismeetodiga nii UV-Vis spektrofotomeetrilisel kui ka tuumamagnetresonants-spektromeetrilisel meetodil. Tööd alustades võeti eesmärgiks koostada kolmele karboksülaatioonile kooskõlalised seondumisasiinsuste skaalad ning leida nende abil seoseid lihtsate retseptormolekulide (keerukamate retseptormolekulide ehituskivide) struktuuri ja erinevate anioonidega seondumise afiinsuste vahel. Täiendavaks eesmärgiks on anda hinnang kasutatud mõõtmismeetodile, selle realiseerimisele UV-Vis ja TMR spektromeetria baasil ning selle kasutatavusele väikeste seondumisasiinsuse erinevuste tuvastamisel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Supramolekulaarne keemia

Supramolekulaarne keemia on keemia valdkond, mis uurib osakeste (molekulide või ioonide) agregate, mida hoiavad koos mittekovalentsed vastasmõjud (interaktsioonid). Mittekovalentne seondumine võib toimuda elektrostaatiliste vastasmõjude, vesiniksidemete, π -vastasmõjude, Van der Waals'i jõudude, doonor-aktseptor sidemete või hüdrofoobsete efektide kaudu [1, 2]. Väga sageli osaleb seondumises mitu erinevat vastasmõju. Supramolekulaarse keemia võib tinglikult jagada kaheks suuremaks valdkonnaks: peremees-külalise ja ise-organiseerumise keemiaks. See, millise valdkonnaga on parajasti tegu, sõltub uuritavate osakeste suurusest, kujust ja protsessi iseloomust (Joonis 1). Kui üks osake on teisest märgatavalt suurem ja on võimeline ennast ümber väiksema osakese mähkima, nimetatakse seda peremeesosakeseks. Väiksemat osakest, mida ümbritsetakse, nimetatakse külalisosakeseks [1]. Peremees-külaline seondumisprotsessidel põhineb nn molekulaarne äratundmine, mille puhul peremehe nn seondumistasku on spetsiaalselt kohastunud just kindla külalisega (või külaliste grupiga) seondumiseks ja on selle jaoks sobiva suurusega, geomeetriaga ja keemilise olemusega. Molekulaarse äratundmise kontekstis nimetatakse peremeest sageli retseptoriks ja külalist substraadiks [1].



Joonis 1. Supramolekulaarse süsteemi moodustumine molekulaarsetest ehituskividest (seondumistaskud on kujutatud ringidena): (a) peremees-külaline komplekseerumine; (b) ise-organiseerumine komplementaarsete molekulide vahel.

Ise-organiseeruvad supramolekulaarsed süsteemid on võimelised komplementaarsetest (kokku sobivatest) molekulidest iseeneslikult tekkima ning võivad olla hästi defineeritud, organiseeritud ja funktsionaalsed [3].

Selektiivse seondumise protsess koosneb kolmest etapist: (i) esmalt toimub põhikomponentide molekulaarne äratundmine; (ii) seejärel süsteem kasvab mitmete komponentide järjestikusel seondumisel, mille käigus saavutatakse molekulide õige paigutus üksteise suhtes; (iii) protsessi lõppemine, see nõuab teatud ehituslikku iseärasust, stoppsignaali, mis määratleb lõpp-punkti ja annab märku, et protsess on jõudnud lõpuni [3].

Looduses on ise-organiseerumine väga levinud, näiteks selle protsessi tulemusel põimuvad vesiniksidemete ja π - π -interaktsioonide abil DNA topeltheeliksi kaks komplementaarset ahelat. Sarnasel viisil toimub näiteks viiruste agregeerumine ja valkude tertsiaarse struktuuri tekkimine [1].

Süntetilised ise-organiseeruvad süsteemid sõltuvad sellest, kuidas on funktsionaalsed molekulid disainitud. Kuna tegemist on iseenesliku protsessiga, siis seondumise üle otsene kontroll puudub ning organiseerumine toimub termodünaamiliselt kõige stabiilsema oleku suunas [1].

Funktsionaalseid molekule disainides on võimalik valmistada nii analüüdile spetsiifilisi kui ka osalise selektiivsusega süntetilisi retseptoreid ning erinevate signaaliülekande mehhanismide abil on võimalik neid muuta sensoriteks.

Esimest korda kirjeldas retseptorite selektiivsust 1894. aastal Emil Fischer, kes ensüüm-substraat komplekse uurides pani alguse nn lukk-ja-võti kontseptsioonile. Ta seletas retseptorite võimet molekulaarselt ära tunda erinevaid substraate molekulide range steerilise sobivusega [4]. Supramolekulaarse keemia arenedes ei suutnud eelnimetatud mudel uute eksperimentide tulemusi enam piisavalt hästi kirjeldada ning Daniel Koshland pakkus välja kohandatud sobivuse (ingl. k. "*induced fit*") teooria [5], mille kohaselt ensüüm ja substraat läbivad mõlemad seostumiseks vajalikke konformatsioonilisi muutusi ning komplementaarsus avaldub eelkõige ensüümi aktiveeritud olekus [5].

Keemiliste sensorite loomisel on selektiivsuse mehhanism väga olulisel kohal. Kunstlike retseptor-substraat süsteemide valmistamisel püütakse jäljendada looduses esinevaid väga spetsiifilisi seostumisi (nt ensüüm-substraat või antigeen-antikeha), kusjuures sensorite valmistamiseks peavad vajalikud vastasmõjud aset leidma tahkis-

vedelik või tahkis-gaas piirpindadel [6]. Aina selektiivsemate retseptormolekulide sünteesimise eesmärgiks on saavutada retseptori spetsiifilisus ja kõrge tundlikkus ühe analüüdi või analüütide grupi suhtes [6, 7].

Süntetiliste retseptorite küllaltki lihtsa molekulstruktuuri tõttu on sageli esinevaks probleemiks madal selektiivsus sarnaste analüütide suhtes [8, 9]. Süntetilised retseptorid reeglina ei suuda võistelda antikehade või aptameeridega, mis seovad lahustest spetsiifiliselt ka suuri ja keerukaid analüüte. Sellest tulenevalt on kasutust leidnud osalise selektiivsusega retseptorite kombineerimine retseptor- või sensorrividesse [10].

Osalise selektiivsusega retseptorid erinevad üksteisest seondumisomaduste poolest, kusjuures need retseptorid ei pea tingimata olema spetsiifilised või väga selektiivsed. Selliste retseptorite kasutamisel on vajalik luua sensorite rivi ning saadavate signaalide kogumit töödeldakse spetsiaalselt sellise lähenemise jaoks välja töötatud muster-protokollide ("sõrmejälgede") järgi. Sensorrivide abil on võimalik segudest määrata nii üksikuid analüüte kui ka erinevaid analüüte samaaegselt. Looduses esineb sarnane toimemehhanism imetajate lõhna- ja maitsemeeltes, kus kemikaale detekteeritakse samaaegselt mitmete tuhandete erinevate valguliste retseptorite abil [10, 11].

Lisaks sensorite selektiivsusele ja tundlikkusele on oluliseks aspektiks ka seondumisprotsessi pöörduvus. Retseptori korduvaks kasutamiseks on vajalik nõrkade vastasmõjude kadumine ja taastumine, sest kovalentsete või iooniliste sidemete tekkel toimub retseptori pöördumatu küllastumine ning sellist sensorit saab kasutada ainult ühe korra [12].

1.2. Mittekovalentsed vastasmõjud

Molekulaarseks äratundmiseks on vajalik substraadi spetsiifiline ja mittekovalentne seostumine retseptormolekuliga. Supramolekulaarses süsteemis on tähtis arvestada erinevate vastasmõjude (e interaktsioonide) koosmõju ja toimet nii retseptorile, substraadile kui ka neid ümbritsevale keskkonnale (nt solvatatsioonile,ioonpaardumisele, kristallvõrele, gaasifaasile jne) [4].

Mittekovalentsed vastasmõjud, mis supramolekulaarseid komplekse koos hoiavad on märgatavalt nõrgemad kui kovalentne side: üksiksideme energiad ulatuvad 150 kJ mol^{-1} kuni 450 kJ mol^{-1} -ni. Mittekovalentsete sidemete energia varieerub

dispersioonijõudude 2 kJ mol^{-1} -st (seejuures Londoni jõud võivad olla ka kordades tugevamad) kuniioon-ioon vastasmõjudele omase 300 kJ mol^{-1} -ni (Tabel 1).

Tabel 1. Molekulidevahelised vastasmõjud ja nende umbkaudsed energiad [1, 4, 13].

Vastasmõju	Vastasmõju energia (kJ mol^{-1})	Näide
Ioon-ioon	200-300	Tetrabutüülammooniumkloriid
Ioon-dipool	50-200	Leelismetall-krooneeter
Dipool-dipool	5-50	Kaks dimetüülsulfoksiidi molekuli
Vesinikside	4-120	Indolokarbasool-atsetaat
Katioon- π	5-80	K^+ benseenis
Anioon- π	10-20	Cl^- ja triasiin
π - π	0-50	Benseen ja grafiit
Van der Waals ^a	$< 5 \text{ kJ mol}^{-1}$, varieerub olenevalt vastasmõju pindalast	Argoon, pakkumine molekulaarsetes kristallides
Hüdrofoobne	Seoses solvent-solvent vastasmõju energiaga	Tsüklodekstriini ühendid

^a Välja arvatud Londoni dispersioonijõud, mis on mittesuunalised ja seega väheolulised supramolekulaarses disainis [1].

Neutraalsete retseptorite korral on peamiseks vastasmõjude tsentriteks vesiniksideme-donoorsed rühmad. Vesiniksidemete suunalisus annab võimaluse disainida külalisega komplementaarseid retseptoreid [14]. Seejuures teiste vastasmõju liikide lisandumine suurendab seondumisafiinsust veelgi. Supramolekulaarsed kompleksid on sageli küllaltki püsivad tänu mittekovalentsete vastasmõjude kooperatiivsusele [1].

1.3. Retseptormolekulide disain

Retseptormolekule disainitakse erinevat tüüpi substraatidele. Laialdaselt on sünteesitud retseptoreid, mis tunnevad ära siirdemetallide ioone, kuid substraatideks võivad olla ka mitmesugused muud katioonsed, anioonsed või neutraalsed orgaanilised, anorgaanilised ja bioloogilised ühendid [9].

Selektiivsuse saavutamiseks peavad retseptor ja konkreetne substraat seonduma võimalikult suures ulatuses, kusjuures teiste võimalike substraatidega peab seondumine olema võimalikult nõrk. Sobiva geomeetriaga retseptor saab külalisega

seonduda mitmete erinevate mittekovalentsete interaktsioonide kaudu, olles sel viisil selektiivne just teatud suurust, kuju ja ehitust omava külalise suhtes. Retseptorite ja substraatide liikuvust mõjutab tasakaal jäikuse ja paindlikkuse vahel. Jäigad retseptorid võivad olla väga selektiivsed, kuid substraadi dünaamilisuse muutudes osutuvad kasulikumaks just paindlikumad retseptorid [9].

Substraadi stabiilne ja selektiivne seondumine sõltub sellest, kui efektiivselt on retseptori seonduvad rühmad seondumistaskuks koondunud ning millise sobiva mustri need moodustavad.

1.3.1 Anioone siduvad retseptorid

Bioloogilisest seisukohast on anioonidel suur tähtsus, sest üle 70% kõigist bioloogilistest kofaktoritest ja substraatidest on anioonsed. On avaldatud arvukalt teadustöid, kus soovitakse kasutada anioone siduvaid retseptoreid keskkonnauuringutes ja biomeditsiinilistes rakendustes [14, 15]. Analüütilise keemia valdkonnas tuntakse huvi uute molekulide ja seadmete vastu, mis oleksid võimelised selektiivselt siduma ja määrama üha väiksemaid koguseid saasteaineid või biomeditsiiniliselt olulisi anioone [15, 16].

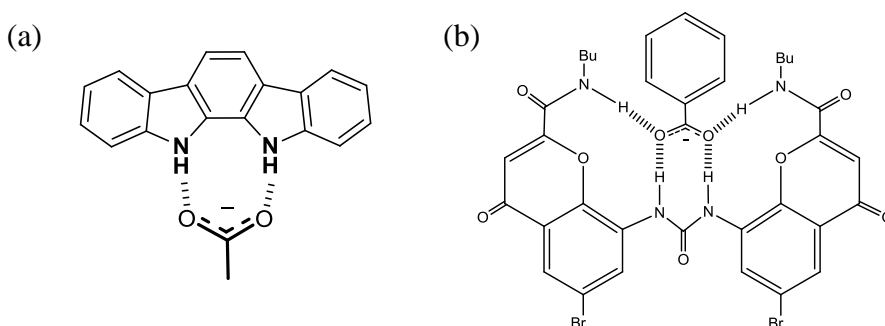
Anioonide seondumisel osutuvad oluliseks retseptorite neutraalsed või positiivselt laetud vesiniksideme doonorid, mis on vastasmõjude asukohaks. Palju on kasutatud ammoonium ja guanidiinium-rühmasid, mis moodustavad $+N-H\cdots X^-$ sidemeid. N-heterotsüklite ja amiidide korral interakteeruvad anioonidega summaarselt neutraalsed rühmad, millel on märgatava positiivse osalaenguga vesinikuaatomid. Lisaks võivad vastasmõjude asukohtadeks olla nii elektrondefitsiitsed tsentrid (boor, tina) kui ka komplekside tsentraalsed metalliioonid [9].

Anioonide retseptormolekulidena on palju uuritud ammooniumsooladest valmistatud polüammoonium-makrotsükleid ja makropolütsükleid [9, 17]. Need ühendid on võimelised siduma erisuguseid anioone ühendeid (anorgaanilised anioonid, karboksülaadid, fosfaadid), kusjuures seondumise stabiilsus ja selektiivsus saavutatakse nii elektrostaatiliste kui ka struktuursete efektide abil.

Neutraalse retseptori afiinsus anioonide suhtes on enamasti madalam kui katioonisel retseptoril. Samas, neutraalsetel retseptoritel ei ole vastasiooni, mis katioonsetel retseptoritel on vältimatu ja võib uuritava iooniga konkureerida. Samuti on neutraalsed retseptorid enamasti parema selektiivsusega [1]. Seejuures peab

arvestama, et neutraalsed retseptorid ei seo ainult anioone, vaid võivad teatud juhtudel seonduda ka vastas-katiooniga. Nii katioonsete kui ka neutraalsete retseptorite korral konkureerivad uuritavate anioonidega solvendimolekulid, kusjuures nende mõju on tugevam katioonsete retseptorite korral [14].

Tüüpilised anioone siduvad neutraalsed retseptorid sisaldavad mitmeid tugevaid vesiniksideme doonoreid. Anioonide äratundmiseks on kasutatud vesiniksideme doonorsete rühmadena amiide (sh uurea ning tiouurea), sulfoonamiide ja lämmastik-heterotsükleid. [16]. Joonisel 2a on kujutatud lihtsa retseptori – indolokarbasooli – seondumine karboksülaatrühmaga (atsetaatiooni näitel). Joonisel 2b on kujutatud keerukamalt uurea-põhist retseptorit [1], mis seob efektiivselt bensoaatiooni. Oluliseks molekulaarseks ehituskiviks, mis kujundab retseptorile iseloomuliku struktuuri, on uurea struktuur. Teiseks on uurea rühm osa bensoadi seondumistaskust. Kaks sümmeetrilist butüülrühma stabiliseerivad kompleksi, olles hüdfoobses vastasmõjus aniooni benseenituumaga. Retseptoril on lisaks veel kaks amiidrühma, mis saavad anda täiendavaid vesiniksidemeid. Neli NH rühma interakteeruvad okso-aniooniga (nt bensoaat), nagu on näidatud Joonisel 2b.



Joonis 2. (a) Indolokarbasooli seondumine atsetaatiooniga. (b) Bensoaatiooni seondumine neutraalse retseptoriga [1].

Asendatud indolokarbasoolid

Indolokarbasooli molekulis (Joonis 4, aine **1**) on kaks pürrooli heterotsükklilist alamühikut ühendatud benseenituumaga ning mõlemale pürroolile on lisatud täiendav benseenituum. Selline planaarne konjugeeritud ühend on konformatsiooniliselt stabiilne ja hea vesiniksidemete doonor [18]. Kahe NH rühma abil saab indolokarbasool anda kaks üksikut vesiniksidet ning selliselt seonduda „kahehambalisi“ külalisi (nt karboksülaatioone, Joonis 2a). Monoatomaarse külalise

(nt Cl^-) korral seotakse külaline korraga kahe vesiniksidemega, mis tagab stabiilsema kompleksi moodustumise kui võimaldavad ühe vesiniksideme doonoriga ühendid.

Esimest korda demonstreeris erinevate indolokarbasooli derivaatide sobivust anioonide sidumiseks 2005. aastal Beer'i töörühm Oxfordi ülikoolist [19]. Indolokarbasooli retseptorite süntees põhines Fischer'i indoolreaktsioonil, kasutades sobivate arüülrühmadega hüdrasiini ja 1,2-tsükloheksaandioone. UV-Vis tiitrimise meetodil mõõdeti indolokarbasooli seondumist erinevatele anioonidele (F^- , Cl^- , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^-$, H_2PO_4^- , HSO_4^-), kusjuures atsetoonis moodustusid uuritud anioonidest kõige tugevamad kompleksid just bensoaatiooniga [19].

Asendatud uuread

Uurea molekulis (Joonis 4, aine 12) on kaks aminorühma ühendatud karbonüülrühmaga. Alates 1992. aastast on sünteesitud mitmesuguseid uurea-laadseid anioonide retseptoreid ning uurea *N,N'*-asendatud derivaadid on tänaseni vägagi huvipakkuvateks ühenditeks anioonide koordinatsiooni keemias [20]. 1992. aastal leidis Wilcox'i grupp, et uurea derivaadid seonduvad vähepolarses CH_2Cl_2 lahuses fosfonaatidega, sulfaatidega ja karboksülaatidega, moodustades stabiilseid 1:1 komplekse, mida hoiavad koos kaks paralleelset $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ vesiniksidet [21]. Uuritud anioonidest moodustus kõige stabiilsem kompleks bensoadiga, mille korral assotsiatsioonikonstant oli $K = 2,7 \cdot 10^4$ [21]. Aasta hiljem näitas Hamiltoni töögrupp TMR tiitrimise meetodil, et polarses $\text{DMSO}-d_6$ lahuses moodustavad *N,N'*-dimetüülurea ja atsetaatioon vesiniksidemete vastasmõjul 1:1 kompleksi ($K = 45$) [22].

Lihtsamad sümmeetrilised ja mittesümmeetrilised ühe uurea alamühikuga retseptorid sisaldavad kahte vesiniksideme doonorset NH rühma. Lisaks on sünteesitud keerukamaid, mitme uurea alamühikuga retseptoreid, mis sisaldavad makrotsükleid ja erinevates asendites alküülrühmi, et suurendada afiinsust uuritava analüüdi suhtes [20, 22].

1.4. Karboksülaatioonid

Karboksüülrühm on oluline funktsionaalrühm nii bioloogilistes kui ka sünteetilistes orgaanilistes molekulides. Etaanhape ja piimhape võtavad osa hulgalistest biokeemilistest protsessidest, lisaks on etaanhape oluline vaheühend keemilises sünteesis. Di- ja trikarboksülaadid nagu tsitraat, suksinaat, malaat ja α -ketoglutaarat

on tsitraaditsükli kesksed metaboliidid [16]. Karboksüülhapete hulka kuuluvad ka aminohapped ja rasvhapped.

Karboksüülrühma deprotoneerumisel tekkiv karboksülaatioon on resonants-stabiliseeritud, sest negatiivne laeng on delokaliseeritud kahe hapnikuaatomi vahel. Seega karboksülaatioonide molekulaarseks äratundmiseks sobivad bidentaatsed retseptorid, mis on võimelised andma kahte sobiva geomeetriaga vesiniksidet (Joonis 2a). Keerukamate retseptorite korral võib vesinikdonoorseid rühmi olla ka rohkem (Joonis 2b). Karboksülaatrühmaga seotud rühmale on karboksülaatrühma negatiivne laeng delokaliseeritud vaid piiratult, kuna see delokalisatsioon toimub põhiliselt vaid induktsioonefekti kaudu. Mida tugevam induktsioonaktseptor on see rühm, st mida efektiivsemalt see rühm hajutab negatiivset laengut karboksülaatrühma hapniku aatomitelt ära, seda tugevam hape on vastav karboksüülhape. Karboksüülhapete tugevuse alusel saab ligikaudu hinnata nende seondumisafiinsust vesiniksidemeid andvate neutraalsete retseptoritega. Nõrga happe konjugeeritud alus on tugevama vesiniksideme aktseptor ning seetõttu on ootuspärane, et seondumisafiinsus kasvab reas laktaat < bensoaat < atsetaat < trimetüülatsetaatioon [4, 16]. See happe tugevus pole siiski ainus faktor, mis määrab seondumisafiinsuse. Oluline on ka aniooni kuju ja laengujaotus aniooni muudes osades. Seda eriti siis, kui tegemist on keerukama struktuuriga retseptoriga.

1.5. Solvendi roll anioonide seondumisel retseptoritega

Vesi on bioloogiliste süsteemide loomulik lahusti ja soodustab apolaarset agregatsiooni ja elutegevuseks vajalikke komplekseerumise protsesse. Seetõttu on komplekseerumisnähtuste uurimine vesikeskkonnas vägagi huvipakkuv [23]. Olukorras, kus retseptor-aniooni seundumine toimub eelkõige vesiniksidemete abil, käitub vesi kui tugev vesiniksidemete doonor ja aktseptor vägagi konkureeriva solvendina – seda nii retseptori kui ka aniooni suhtes. Lisaks on retseptori ja aniooni seondumise tasakaalu uurimiseks lahustes oluline, et nii reagentid kui produktid oleksid kasutatavas solvendis lahustunud, kuid paljud orgaanilised retseptormolekulid vees ei lahustu [16]. Seega enamasti tehakse retseptor-anioon seondumiste alusuuringud vesi-orgaanika segudes, kusjuures on eeldatav, et seondumiskonstandid kasvavad solvendi polaarsuse alanedes, st reas vesi < dimetüülsulfoksiid (DMSO) < atsetonitriil (MeCN) < triklorometaan (CHCl₃) < tetraklorometaan (CCl₄) [4]. Orgaanilistele solventidele vee lisamine tagab hästi määratletud vee sisalduse lahustis

ning seeläbi anioonide ja retseptorite reprodutseeritava solvatatsiooni eri eksperimentide vahel, parandades seeläbi mõõtmiste korratavust [24, 25].

1.6. Seondumiskonstandid

1.6.1 Retseptor-anioon komplekside seondumiskonstandid

Retseptori ja aniooni seondumine on tasakaaluline protsess. Retseptori (RH) ja aniooni (A^-) seondumisel 1:1 stöhiomeetria korral tekib retseptor-anioon kompleks (RHA^-), mida kirjeldab järgmine tasakaal:



Assotsiatsiooni- ehk seondumiskonstant K_{ass} (või selle logaritm $\log K_{ass}$) väljendab kvantitatiivselt assotsiatsiooni ulatust ning iseloomustab retseptori afiinsust külalise suhtes. Seondumiskonstant arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$K_{ass} = \frac{a(RHA^-)}{a(RH)a(A^-)} \quad (2)$$

, kus $a(RHA^-)$, $a(RH)$ ja $a(A^-)$ on vastavate osakeste aktiivsused lahuses.

Kompleksimoodustumise kvantitatiivse kirjeldamise abil saab võrrelda erinevaid molekulaarse äratundmise nähtusi. Seondumiskonstantide täpne määramine on oluline nii fundamentaalsete keemiateadmiste kujundamisel, analüüdi spetsiifiliste retseptorite edasiarendusel kui ka nende rakendamisel [26].

Võrrandi (2) alusel seondumiskonstantide määramine eeldab, et osakeste aktiivsused lahuses on usaldusväärselt määratavad. Vaba aniooni aktiivsust lahuses võivad vähendada sellised nähtused naguioon-paardumine [27] ja homokonjugatsioon (happe ja happe aniooni assotsiatsioon) [28]. Kasutades mõõtelahusena orgaanilisi solvente, võib väike veesisaldus põhjustada vesiniksideme doonorite ja aktseptorite selektiivset solvatatsiooni ning selliselt vähendada vesiniksidemete tugevust. Kui veesisaldus on halvasti kontrollitav, siis saadakse ebastabiilsed tulemused. Eelnimetatud süstemaatiliste efektide vähendamiseks on meie töögrupis varasemalt välja töötatud suhteline mõõtmismeetod tasakaalude uurimiseks

mittevesikeskkondades [28, 29], mille retseptor-anioon seondumise mõõtmiste jaoks kohandas K. Haav. Selle meetodi korral mõõdetakse samas solvendis lahustatud kahe retseptori (R_1H ja R_2H) seondumisafiinsuste erinevusi sama analüüdi suhtes:



Suhteline seondumisafiinsus $\Delta \log K_{\text{ass}}$ arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log K_{\text{ass}}(R_1HA^-) - \log K_{\text{ass}}(R_2HA^-) = \log \frac{[R_1HA^-][R_2H]}{[R_2HA^-][R_1H]} \quad (4)$$

Suhtelise mõõtmismeetodi korral mõjutab solvent mõlemat retseptormolekuli samamoodi. Sellest tulenevalt taanduvad mitmed mõõtemääramatused ja süstemaatilised efektid välja ning seondumiskonstante on võimalik määrata kõrge täpsusega [30].

1.6.2 Seondumiskonstantide mõõtmine

Seondumiskonstante saab mõõta selliste eksperimentaalsete meetoditega, mis retseptori, aniooni või retseptor-anioon kompleksi kontsentratsiooni muutudes annavad informatsiooni retseptor-anioon kompleksi kontsentratsioonist. Seejuures kasutatav kontsentratsioonivahemik tuleb valida selliselt, et piisavalt suure koguse vaba ja seotud retseptori ja aniooni vahel oleks tasakaal. See nõue seab erinevatele meetoditele piirangud, millistes kontsentratsioonide ulatuses ning millises seondumiskonstantide vahemikus saab neid seondumiskonstantide mõõtmiseks kasutada [4].

Tuumamagnetresonants (TMR) -spektromeetrilise tiitrimise käigus jälgitakse keemilise nihke (δ) muutust sõltuvalt lisatud titrandi kogusest. Igas tiitrimise etapis registreeritud spektrist leitakse retseptor-aniooni seondumis- ehk assotsiatsioonimäär järgmise valemiga:

$$\beta = \frac{[RHA^-]}{[RH] + [RHA^-]} = \frac{\delta - \delta(RH)}{\delta(RHA^-) - \delta(RH)} \quad (5)$$

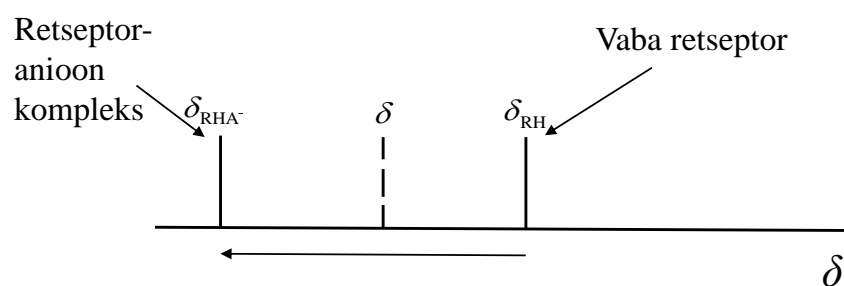
, kus δ on keemiline nihe kindlas tiitrimise etapis, $\delta(RH)$ ja $\delta(RHA^-)$ on vastavalt vaba retseptormolekuli ja retseptor-anioon kompleksi keemilised nihked. Enne tiitrimise

algust registreeritud uuritava tuuma (nt ^1H , ^{13}C või ^{15}N) keemiline nihe iseloomustab vaba retseptori ehitust ja omadusi. Tiitrimise lõpp-punktis registreeritud keemiline nihe iseloomustab retseptor-anioon kompleksi [26].

TMR-spektromeetriliste meetoditega saab seondumiskonstante määrata kahel juhul:

- 1) Toimub retseptor-aniooni tasakaaluline komplekseerumine, kusjuures aniooni vahetumise kiirus on võrreldes TMR mõõtmise ajaskaalaga väga aeglane.
- 2) Toimub retseptor-aniooni tasakaaluline komplekseerumine, kusjuures võrreldes TMR mõõtmise ajaskaalaga toimub aniooni vahetumine väga kiiresti.

Olukorras, kus tasakaaluolekus aniooni vahetumise kiirus on võrreldav TMR mõõtmise ajaskaalaga, piigid TMR spektris laienevad ja/või kaovad ning sellisel juhul ei saa seondumiskonstante leida. Temperatuuri ja solvendi vahetusega saab seondumisprotsessi kiirust muuta, näiteks temperatuuri tõstmine ja anioonidega konkureerivam solvent üldiselt kiirendab protsessi [16]. Molekulaarse äratundmise korral vesi või vesi-orgaanika segus on seondumine TMR ajaskaalast tunduvalt kiirem protsess ja seetõttu on vabale retseptorile ja retseptor-anioon kompleksile vastav signaal keskmistunud ning TMR spektris on näha korraga ühte piiki (Joonis 3) [26].



Joonis 3. TMR tiitrimist illustreeriv TMR spekter, kus vabale retseptorile aniooni lisamine põhjustab keemilise nihke (δ) muutuse suuremate δ väärtuste suunas. Iga piik vastab vaba retseptori ja retseptor-anioon kompleksi keskmistunud signaalile.

Sandip A. Kadam meie töörühmas [31] näitas esmakordselt TMR meetodi sobivust suhteliste seondumiskonstantide määramiseks vastavalt eelpool kirjeldatud põhimõttele. Kirjeldatud meetodiga saab leida seondumisasiinsuseid rohkem kui kahele retseptorile korraga, seejuures seondumisasiinsuste erinevus leitakse järgmise valemiga:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log \frac{\beta_1(1-\beta_2)}{(1-\beta_1)\beta_2} \quad (6)$$

, kus β_1 ja β_2 on mõõdetavate retseptorite R_1 ja R_2 assotsiatsioonimäärad, mis arvutatakse retseptorite segu tiitrimise spektritest valemi (5) abil. Mida suurem on retseptori seondumisafiinsus, seda suurem on retseptor-anioon kompleksi osakaal lahuses ning seda kiiremini liigub tiitrimise käigus vastava retseptori signaal [32].

TMR absoluutmõõtmistega on võimalik määrata seondumiskonstante vahemikus 10^1 kuni 10^4 [27] ning suhtelise mõõtmismeetodiga K_{ass} väärtusteni 10^6 [31]. Erinevalt teistest tiitrimismeetoditest, saab tiitrimise käigus TMR spektritest lisainformatsiooni võimalike kõrvalprotsesside kohta nagu deprotoneerumine või assotsiatsioon [26, 31].

UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise käigus mõõdetakse UV või nähtava valguse neeldumise intensiivsust kindlal lainepikkusel, mis valitakse selliselt, et vaba retseptori ja retseptor-anioon kompleksi neelduvused (kui anioon neelab tugevalt, siis on vajalik ka aniooni neelduvust arvesse võtta) sellel lainepikkusel oleksid võimalikult erinevad. Mõõdetud neelduvuse sõltuvust 1:1 kompleksi kontsentratsioonist väljendab valem:

$$A_{\text{eksp}} = \epsilon(RH)[RH]_0 + \epsilon(A^-)[A^-]_0 - \{\epsilon(RHA^-) - \epsilon(RH) - \epsilon(A^-)\}[RHA^-] \quad (7)$$

, kus A_{eksp} on mõõdetud neelduvus, $\epsilon(RH)$, $\epsilon(A^-)$, $\epsilon(RHA^-)$ vastavalt retseptori, aniooni ja retseptor-aniooni kompleksi molaarsed neelduvused. $[RH]_0$ ja $[A^-]_0$ on vastavalt retseptori ja aniooni algkontsentratsioonid ning $[RHA^-]$ on retseptor-anioon kompleksi kontsentratsioon mõõtmise hetkel. Valemist (7) järeldub, et $A_{\text{eksp}} - \epsilon(RH)[RH]_0 - \epsilon(A^-)[A^-]_0$ on proportsionaalne kompleksi kontsentratsiooniga $[RHA^-]$, sest $\{\epsilon(RHA^-) - \epsilon(RH) - \epsilon(A^-)\}$ on konstant. Retseptori ja aniooni molaarsed neelduvused leitakse mõõtmistest, kus kasutatakse puhtaid retseptori ja aniooni lahuseid. Kontsentratsioonid $[RH]_0$ ja $[A^-]_0$ on teada, sest need on eksperimendi läbiviija poolt ette antud. Seega UV-Vis spektrofotomeetria absoluutmõõtmisest leitakse $(A_{\text{eksp}} - \epsilon(RH)[RH]_0 - \epsilon(A^-)[A^-]_0)$. Olukorras, kus anioon UV ega nähtavat valgust ei neela, tuleb registreerida ainult puhta retseptori neeldumisspekter.

Sel juhul on molaarne neelduvus $\varepsilon(A^-)$ võrdne nulliga ning valem (7) lihtsustub:

$$[RHA^-] = \frac{A_{\text{eksp}} - \varepsilon(RH)[RH]}{\varepsilon(RHA^-) - \varepsilon(RH)} \quad (8)$$

Kuna retseptor-anioon kompleksi molaarne neelduvus pole otseselt mõõdetav, tuleb kompleksi kontsentratsiooni leidmiseks läbi viia tiitrimine ja regressioonanalüüs [26].

UV-Vis meetodi sobivust suhteliste seondumiskonstantide määramiseks näitas meie töörühmas K. Haav [30]. Spektrofotomeetrilise tiitrimise käigus registreeritakse kahe puhta retseptorlahuse tiitrimise spektrid ning seejärel mõlemat retseptorit sisaldava segu tiitrimise spektrid. Spektri andmetest arvutatakse multilineaarset regressiooni kasutades mõlema retseptor-anioon kompleksi dissotsiatsioonimäärad järgmise valemiga:

$$\alpha = \frac{[RH]}{[RH] + [RHA^-]} = \frac{A^\lambda - A^\lambda(RHA^-)}{A^\lambda(RH) - A^\lambda(RHA^-)} \quad (9)$$

, kus A^λ on mõõdetud neelduvus kindlas tiitrimispunktis, $A^\lambda(RH)$, $A^\lambda(RHA^-)$ vastavalt vaba retseptori ja retseptor-aniooni kompleksi neelduvused. Retseptoritele R_1H ja R_2H leitud dissotsiatsioonimäärade α_1 ja α_2 abil leitakse suhteline seondumiskonstant järgmiselt:

$$\Delta \log K_{\text{ass}} = \log \frac{\alpha_2(1-\alpha_1)}{(1-\alpha_2)\alpha_1} \quad (10)$$

Võrreldes TMR spektroskoopiaga on fluorestsents- ja UV-Vis spektrofotomeetrilised meetodid tundlikumad, mistõttu saab nendega kasutada madalamaid retseptori ja aniooni kontsentratsioone ning määrata seondumiskonstante K_{ass} väärtusteni 10^7 [26]. Erinevalt fluorestsentsmeetodist esineb neeldumisspektroskoopilisel tiitrimisel sageli üks või enam selget isosbestilist punkti. See on punkt graafikul, kus neeldumise intensiivsus kogu tiitrimise vältel on konstantne. Isosbestilise punkti olemasolu annab kinnitust sellele, et vaba aniooni komplekseerumine toimub võrrandi (1) järgi, ilma oluliste kõrvalprotsessideta [4].

Fluorestsentsitiitrimine põhineb nähtusel, kus retseptorlahuse tiitrimine aniooniga põhjustab fluorestsentsemissiooni intensiivsuse võimendumise või kustumise [16]. Seondumiskonstant leitakse fluorestsentsintensiivsuse muutuse ja lisatud aniooni kontsentratsiooni suhtest [4]. Võrreldes UV-Vis spektrofotomeetriaga on fluorestsentspektroskoopia rakendusala kitsam seetõttu, et paljudel retseptoritel ja retseptor-anioon kompleksidel puuduvad fluorestsentsomadused. Siiski on fluorestsentsitiitrimine retseptor-anioon seondumiste uurimiseks üks tundlikumaid meetodeid, võimaldades määrata seondumiskonstante suurusjärguni 10^8 .

Isotermilise tiitrimise kalorimeetria (ITC) on meetod, kus uuritava retseptormolekuli lahust tiitritakse aniooniga ning mõõdetakse seondumisreaktsiooni käigus neeldunud või vabanenud soojust, mis on otseses sõltuvuses seondumisreaktsiooni entalpiaga [33]. Lisatud titrandi koguse ja tekkinud soojusefekti sõltuvusest saab määrata seondumiskonstante, entalpia muutusi (ΔH) ja lahuses olevate molekulide seondumise stõhhiomeetriaat [16]. Mõõtmistulemustest saab arvutada Gibbs'i vabaenergia muutuse (ΔG) ja entroopia muutuse (ΔS) järgmise sõltuvuse abil:

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{ass}} = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

, kus R on universaalne gaasikontant ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) ja T absoluutne temperatuur (K).

ITC meetodiga saab määrata seondumiskonstante vahemikus 10^1 kuni 10^9 , sest kasutusel olevate äärmiselt tundlike ITC instrumentidega on võimalik mõõta soojusefekte, mis tekivad vaid nanomooli titrandi lisamisel [33]. Lisaks annab ITC meetod lisainformatsiooni seondumise termodünaamika kohta, mida saab kasutada ühendite edasisel optimeerimisel.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Aparatuur ja töövahendid

2.1.1 UV-Vis spektrofotomeeter

UV-Vis spektrofotomeetriliseks tiitrimiseks kasutati kahekiirelist spektrofotomeetrit Thermo Nicolet Evolution 300. Instrumendi mõõteküvetihoidja oli termostateeritav ja varustatud magnetsegajaga. Spektrofotomeetri pilulaius oli 1,5 nm ja andmete kogumise samm 1 nm. Spektrite registreerimisel kasutati “*intelliscan*” režiimi, mille käigus spektrofotomeeter muudab skaneerimiskiirust vastavalt sellele, kui tugevalt neelduvus sõltub lainepikkusest. Seejuures neeldumise järsu kasvu või kahanemise ehk piigi alguse või lõpu ajal skaneerimiskiirust vähendatakse ning kui neeldumine muutub lainepikkuse muutudes vähe, siis skaneerimiskiirust suurendatakse. Selliselt varieerub spektri skaneerimiskiirus 120 nm/min kuni 1200 nm/min. Spektromeetri tööd juhiti arvuti abil, kasutades programmi VisionPro 2.03. Registreeritud spektrite andmed viidi programmi MS Excel, kus neid matemaatiliselt töödeldi.

2.1.2 Tuumamagnetresonants-spektromeeter

Tuumamagnetresonants (TMR) -spektromeetrilisi mõõtmisi teostati Bruker Avance II 200 TMR spektromeetriga. Protonspektrid mõõdeti sagedusel 200 MHz (magnetvälja tugevus 4,7 T) ning seejuures kasutati TMR spektromeetrit juhtiva programmi vaikesätteid (automaatne Fourier’ teisendus, faasi- ja baasijoonede korrektsioon). Spektromeetri temperatuurikontrolli abil reguleeriti temperatuur 25°C juurde. Ühe spektri skaneerimiste arvu varieeriti 20-st kuni 50-ni vastavalt vajadusele. Huvipakkuvatele piikidele lisati nende maksimumid ppm skaalas.

2.1.3 Teised kasutatud töövahendid

Mõõte- ja võrdlusküvettidena UV-Vis mõõtmistel kasutati 1 cm kihipaksusega kvartsküvette. Võrdlusküvett oli teflonkorgiga, mõõteküvett oli varustatud tefloniga kaetud magnetsegaja pulgaga ja oli suletav keeratava plastikkorgiga, milles oli tefloniga kaetud silikoonist septum. TMR mõõtmisteks kasutati 5 mm läbimõõduga tuube.

Ainete lahused valmistati gravimeetriliselt boorsilikaadist viaalidesse (4 ml ja 15 ml). Jälgiti, et kasutatud viaalid ja TMR tuubid oleksid vabad seintele adsorbeerunud veest ning selleks kuumutati neid eelnevalt kuivkapis. Tahkeid aineid võeti spaatliga ja

lahusekoguste lisamiseks kasutati sobivat automaatpipetti. Ainete ja lahuste kaalumiseks kasutati Sartorius CPA225D-0CE analüütilist kaalu (lahutusvõimega 0,00001 g).

Titrandi lahuse valmistamiseks kasutatavaid tetrabutüülammoonium soolasid, 1,3-biskarbasolüüluureat ja 1,3-bisindolüüluureat hoiustati inertgaasi keskkonnas MBraun UNIlab kuivkapis. Kuivkapi kasutamise ajal reguleeriti kapisisene rõhk -2,6 millibaarini ning ajal, mil kappi ei kasutatud, hoiti seal kerge ülerõhk ($\geq 3,2$ millibaari). Vajalikud töövahendid viidi kuivkappi väikese lüüsi kaudu, mida vakumeeriti kolm korda. Vajalikud ained kaaluti Sartorius P225D-DCE kaalul (lahutusvõime 0,00001 g) ning toodi seejärel kuivkapist välja. Sama lüüsi kasutati ka UV-Vis spektrofotomeetri mõõteküveti kuivatamiseks.

UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste korral lisati solventi küveti ja viaalidesse Hamilton Gastight 2,5 ml süstla abil, ainete alglahuseid Hamilton Gastight 50 μ l ja 100 μ l süstaldega. TMR-spektromeetriliste mõõtmise korral valmistati lahused otse TMR tuubidesse ning lahuste segamiseks kasutati ultraheli ja mehhaanilist loksutamist. Mõlema meetodi korral kasutati titrandi lisamiseks automaatdosaatoriga varustatud Hamilton Gastight 100 μ l süslaid, mis võimaldavad lisada väikseid reprodutseeritavaid lahuse koguseid 2 μ l sammuga.

2.2. Kasutatud kemikaalid

2.2.1 Solvent

Solvendina kasutatav 0,5% veesisaldusega (m/m) dimetüülsulfoksiid valmistati gravimeetriselt DMSO-st (Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$) ja veest, mida võeti MilliQ Advantage A10 veepuhastist. Sarnaselt valmistati ka TMR-spektromeetrilistes mõõtmistes kasutatud 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud dimetüülsulfoksiid, milles sisalduva DMSO kõik kuus vesinikku on asendatud deuteeriumiga (DMSO- d_6) (Sigma-Aldrich, 99,8%). Mõlema solvendi veesisaldus määrati kulonomeetrisel Karl Fischeri tiitrimisel, kasutades Karl-Fischeri titraatorit Mettler Toledo DL32. Määratud veesisaldused varieerusid vahemikus 0,48% kuni 0,51%.

Solvendi stabiilne 0,5% veesisaldus tagab mõõteseeriates karboksülaatioonide ja retseptormolekulide ühetaolise solvatatsiooni. Taolisi veelisandiga orgaanilisi solvente on kasutatud erinevates uurimustes [24, 25] just seetõttu, et vältida väikestest

Uuritud sünteetilistest retseptoritest olid kaubanduslikult kättesaadavad 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea (**14**) (Sigma-Aldrich, 99%) ja 1,3-difenüüluurea (**12**) (Sigma-Aldrich, 98%). Retseptorid 1,3-biskarbasolüüluurea (**16**) ja 1,3-bisindolüüluurea (**17**) sünteesiti Philip Gale'i töögrupis Southamptoni ülikoolis [34]. Järgnevalt loetletud retseptormolekulid sünteesis meie laboratooriumis doktorant Sandip A. Kadam: Indolokarbasool (**1**), 2,7-Cl₂-indolokarbasool (**5**), 1-Cl-indolokarbasool (**6**), 4-NO₂-indolokarbasool (**7**) (avaldatud, [30]) ja 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool (**2**), 2,7-(BuOCO)₂-indolokarbasool (**3**), 2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasool (**4**), 2-BuOCO-indolokarbasool (**8**), 2-CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool (**9**), 2-C₆H₅-CH₂-OCO-indolokarbasool (**10**), 2-(4-NO₂-C₆H₄-OCO)-indolokarbasool (**11**), 1-(3-NO₂-fenüül)-3-fenüüluurea (**13**), RM-18 (**18**) (avaldatud, [31]) ning retseptorid 1-(3-C₅H₅N-(CH₂)₃-OCO)-3-fenüüluurea (**15**) ja RM-19 (**19**) (veel avaldamata).

2.2.3 Uuritud karboksülaatioonid

Töös uuriti trimetüülatsetaati, bensoaati ja laktaati, mille lahused valmistati nende anioonide vastavatest tetrabutüülammoonium (TBA) sooladest (TBA bensoaat, Sigma-Aldrich, 99%; TBA laktaat ja TBA trimetüülatsetaat valmistati TBA hüdroksiidist ja vastavalt piimhappest ning pivaliinhappest, Sigma-Aldrich, 99%). Üheks peamiseks kriteeriumiks titrandile oli hea lahustuvus dimetüülsulfoksiidis. Spektrofotomeetrilistel mõõtmistel oli lisaks veel oluline, et titrant ei neelaks analüütilises lainelas (260 nm kuni 600 nm). Käesolevas töös oli vastas-katiooniks valitud tetrabutüülammoonium, et vältida tugevat ioonpaardumist karboksülaatioonidega ning parandada soolade lahustuvust kasutatud solvendis. Kuna tetrabutüülammooniumiooni vastasmõju karboksülaatioonidega on väga nõrk, on seda vastasiooni anioonide seostumise uurimisel palju kasutatud [24, 35-36].

2.3. Retseptorite suhteliste afiinsuste uurimine

2.3.1 UV-Vis spektrofotomeetriline tiitrimine

UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise meetodit kasutati trimetüülatsetaadi uurimiseks. Retseptorite alglahuste valmistamiseks kaaluti boorsilikaadist viaalidesse 0,5 – 2 mg ainet ning lisati soovitava kontsentratsiooni saamiseks vajalik kogus (1 – 1,3 ml) 0,5% veesisaldusega (m/m) dimetüülsulfoksiidi. Retseptormolekulide lahuste kontsentratsioonid jäid vahemikku 0,002 kuni 0,008 M.

Titrandi lahuse valmistamiseks kaaluti viaali 0,13 – 0,14 g tetrabutüülammoonium trimetüülatsetaati ja lisati 2,4 – 2,9 ml solventi. Tiitrimisel kasutati kahe erineva kontsentratsiooniga titranti, lahjendatud titrandi valmistamiseks pipeteeriti viaali 250 – 270 µl kontsentreeritud titranti ning lisati 2,0 – 2,3 ml solventi. Tiitrimist alustati lahjendatud titrandiga (0,014 – 0,015 M) ning retseptor-trimetüülatsetaat kompleksi spektri registreerimiseks lisati tiitrimise lõpus suuremad kogused kanget titranti (0,13 – 0,15 M).

Spektrofotomeetriline tiitrimine teostati temperatuuril $(25,0 \pm 0,3)^{\circ}\text{C}$. Kogu mõõtmise vältel oli võrdlusküvetis puhas solvent. Esmalt lisati mõõteküveti 1,75 ml solventi ja registreeriti spekter, veendumaks, et solvent ei neela analüütilises lainelas. Seejärel korrigeeriti solvendi abil baasijoon. Järgnevalt lisati küveti 20 – 140 µl uuritava retseptori alglahust, kusjuures lisatud kogus valiti aine spektraalsete omaduste järgi. Retseptorite kontsentratsioonid mõõteküvetis olid vahemikus $1,1 \cdot 10^{-5} - 5,0 \cdot 10^{-5}$ M. Registreeriti vaba retseptormolekuli neeldumisspekter. Seejärel hakati mõõteküveti lisama trimetüülatsetaadi lahjendatud titranti ja kuna kompleksi moodustumine ja lisatud aniooni kogused ei ole lineaarses seoses, tuli sellise lahuse saamiseks, milles enam vähem kogu retseptor oli aniooniga komplekseerunud, lisada juba suurem kogus kontsentreeritud titranti. Kuna titrandi lisamisel mõõtelahus lahjeneb, korrutati andmetöötluse etapis iga spektrit läbi lahjendusfaktoriga, mis vastas alglahuse lahjenemise suhtearvule. Selliselt koguti erineval määral komplekseerunud retseptorite R_1H ja R_2H lahustest 12 kuni 15 puhta aine spektrit, mille isosbestilise punkti põhjal hinnati retseptorite spektraalset puhtust. Uuritavad retseptorid valiti selliselt, et nende seondumistugevused aniooniga oleksid lähedased ($\Delta \log K_{\text{ass}} < 1$), kuid nende neeldumisspektrid oleksid võimalikult erinevad. Töö jätkus valitud retseptorite segu tiitrimisega, mille käigus registreeriti 20 kuni 26 spektrit. Kogutud spektritest leiti mõlemale retseptor-anioon kompleksile multilineaarset regressiooni kasutades dissotsiatsioonimäärad ja nende kaudu $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtus (valem 10). Spektri andmete töötlemiseks kasutatud arvutusmeetodite kirjeldused on toodud Lisas 1.

2.3.2 Tuumamagnetresonants-spektromeetriline tiitrimine

TMR-spektromeetriliste mõõtmiste kõrgem selektiivsus võimaldas teostada suhtelise seondumisaafiinuse mõõtmisi kolme retseptormolekuli vahel. Seega, igast tiitrimiseksperimentide seeriast saadi kolm $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtust. Igat retseptorit kaaluti

TMR tuubi 1 kuni 3 mg selliselt, et retseptorite moolide arvud lahuses oleks ligilähedased. Seejärel lisati tuubi 0,7 ml 0,5% veesisaldusega (m/m) deutereeritud dimetüülsulfoksiidi. Retseptormolekulide kontsentratsioonid mõõtmissegus jäid vahemikku 0,007 M kuni 0,025 M. Retseptorid valiti selliselt, et nende NH rühmade prootonite piikide keemiliste nihete väärtused erineksid algselt vähemalt 0,2 ppm võrra. Arvesse tuli võtta ka uuritavate piikide keemiliste nihete muutumise kiirust. Retseptormolekuli piik, mis tiitrimise käigus liigub kiiremini suuremate keemiliste nihete väärtuste suunas, võib hakata kattuma teise retseptormolekuli piigiga, mis liigub aeglasemini või väiksemas ulatuses.

Trimetüülatsetaadi, bensoaadi ja laktaadi tetrabutüülammooniumsoola lahused ehk anioonide titrandid valmistati samamoodi nagu UV-Vis meetodi korral, kasutades deutereeritud solventi. Trimetüülatsetaadi kontsentreeritud titrandi kontsentratsioon oli 1 M ja lahja titrandi kontsentratsioon oli 0,4 M; bensoaadil vastavalt 0,7 M ja 0,6 M ja laktaadil vastavalt 1,9 M ja 0,7 M.

Esmalt registreeriti spekter lahusest, mis sisaldas uuritavaid retseptormolekule ning kontrolliti, kas vabade retseptorite vesiniksideme doonorite prootonpiigid on neile iseloomulike keemiliste nihete väärtuste juures, piisava intensiivsusega ning ei kattu üksteisega. Seejärel alustati lahja titrandi lisamisega ning lõpuks lisati kontsentreeritud titranti, et saavutada uuritavate retseptormolekulide praktiliselt täielik üleviimine kompleksi. Kokku registreeriti 15 kuni 19 spektrit. Kogutud keemiliste nihete muutuste järgi leiti retseptor-anioon kompleksidele assotsiatsioonimäärad valemi (5) abil ning nende kaudu $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtused valemiga (6).

2.4. Indolokarbasooli absoluutsete afiinsuste määramine

Indolokarbasooli kui skaalade ankurühendi absoluutsed afiinsused trimetüülatsetaadi ja laktaatiooni jaoks leiti UV-Vis spektrofotomeetrilisel tiitrimisel. Absoluutsed mõõtmised teostati suhteliste seundumiskonstantide mõõtmistega samadel töötingimustel, samuti kasutati sama solventi. Indolokarbasooli alglahuse valmistamiseks kaaluti boorsilikaadist viaali viiekohalise kaaluga 0.005 g ainet ning lisati soovitava kontsentratsiooni saamiseks vajalik kogus (2,5 ml) 0,5% veesisaldusega (m/m) dimetüülsulfoksiidi. Retseptormolekuli lahjenduse valmistamiseks pipeteeriti 4 ml viaali 180 µl alglahust ning lisati 1,3 ml solventi.

Retseptormolekuli alglahuse kontsentratsioon oli mõlema aniooni korral 0,007 M ning lõpplahuse kontsentratsioon 0,0009 M. Trimetüülatsetaadi kontsentreeritud titrandi kontsentratsioon oli 0,12 M ning lahjendatud titrandi kontsentratsioon 0,01 M. Laktaadi kontsentreeritud titrandi kontsentratsioon oli 0,18 M ning lahjendatud titrandi kontsentratsioon 0,016 M. Sarnaselt suhteliste seondumiskonstantide mõõtmisele, lisati esmalt mõõteküveti 1,75 ml solventi ja teostati baasijooni korrektsioon. Seejärel lisati küveti 65 µl indolokarbasooli lõpplahust ning registreeriti vaba retseptormolekuli spekter. Erinevalt suhteliste seondumiskonstantide mõõtmistest, kaaluti mõõterakku pärast igat titrandi lisamist. Tiitrimise käigus registreeriti 16 kuni 19 spektrit. Retseptor-anioon kompleksi spekter registreeriti tiitrimise lõpus, kui mõõteküveti oli lisatud titrandi stõhhiomeetrilise kogusega võrreldes 4-5 kordne liig, mis tagas praktiliselt kogu retseptormolekuli üleviimise kompleksi koosseisu. Kaalumisandmetest arvutati täpne lisatud titrandi kogus ning spektrite andmetest arvutati kompleksi dissotsiatsioonimäärad valemi (9) abil. Seondumiskonstantide arvutamiseks kasutati kolme erinevat arvutusmeetodit (nagu on kirjeldatud artiklis [30]) . Iga mõõtmise seondumiskonstant leiti kolme arvutusmeetodi tulemuste keskmistamisel. Skaalade ankurpunktiks võeti kõigi paralleelmõõtmiste $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste aritmeetiline keskmine.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Retseptormolekulide afiinsuste skaalade koostamine

Trimetüülatsetaat-, bensoaat- ja laktaatiooni seondumisel erinevatele retseptoritele koostati vastavalt kolm retseptorite afiinsuste skaalat. Iga topeltnool skaalal (redelil) kujutab kahe retseptormolekuli absoluutsete seondumistugevuste erinevuse mõõtmist logaritmilises skaalas ehk $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuse mõõtmist. UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste korral on skaalal esitatud $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtused enamasti mitmel arvutusmeetodil leitud väärtuste keskmised. Iga ühend on seotud skaalasse vähemalt kahe suhtelise afiinsuse väärtuse kaudu ning iga lisanduv mõõtmine ring valideerib täiendavalt kogu skaalat [37].

Redelit moodustavate ühendite absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused leiti eksperimentaalselt mõõdetud $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste ja retseptormolekulidele assigneeritud absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste erinevuste ruutude summat (SS) minimeerides, muutes assigneeritud $\log K_{\text{ass}}$ väärtusi [28]. SS leitakse järgmise valemi järgi:

$$SS = \sum_{i=1}^{n_m} \{ \Delta \log K_{\text{ass}}^i - [\log K_{\text{ass}}(\text{R}_2\text{HA}^-) - \log K_{\text{ass}}(\text{R}_1\text{HA}^-)] \}^2 \quad (12)$$

Iga $\Delta \log K_{\text{ass}}^i$ väärtus on retseptorite R_2H ja R_1H eksperimentaalselt mõõdetud suhteline seondumistugevus. Skaalade kõigi ühendite absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on arvutatud vähimruutude meetodil, kusjuures skaalade ankurdamispunktideks on võetud indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtused erinevate anioonide suhtes. Tulemuste kooskõllalisust ehk mõõdetud $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste ja määratud absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste kokkulangemist saab hinnata kooskõllalisuse standardhälbe s järgi [29]. See leitakse järgmise valemiga:

$$s = \sqrt{\frac{SS}{n_m - n_a}} \quad (13)$$

, kus n_m on $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmiste arv ja n_a on leitud absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste arv. Kooskõllalisusparameeter s on seega kõigi mõõdetud suhteliste afiinsuste keskmine määramatus standardhälbe kujul esitatuna.

Trimetüülatsetaatiooni seondumise skaala koostamiseks uuriti seitssetteistkümnet sünteetilist retseptormolekuli. 16 $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust on leitud UV-Vis spektrofotomeetrilise meetodiga ning 21 TMR-spektromeetrilise meetodiga, kusjuures kahte $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust on mõõdetud mõlema meetodiga. Selliselt saadud trimetüülatsetaadi seondumisafiinsuste skaala on toodud Tabelis 2. Trimetüülatsetaatiooni seondumise skaala ulatuseks on 2,31 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalispärane parameeter $s = 0,05 \log K_{\text{ass}}$ ühikut. Kui töödelda TMR ja UV-Vis mõõtmisi eraldi, siis on s väärtused vastavalt 0,002 ja 0,03 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut.

Tabel 2. Trimetüülatsetaatiooni seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	U^c (k=2)	$\Delta\log K_{\text{ass}}$
1,3-biskarbasolüüluurea	5.38	0.02	0.05	0.09	
1,3-bisindolüüluurea	5.15	0.03	0.05	0.10	
3,4,4'-Cl ₃ -difentüüluurea	4.24	0.02	0.04	0.09	
RM-18	4.10	0.01	0.04	0.08	
4-NO ₂ -indolokarbasool	4.07	0.06	0.07	0.14	
1-(3-NO ₂ -fentüül)-3-fentüüluurea	4.01	0.05	0.06	0.12	
2,9-(BuOCO) ₂ -indolokarbasool	3.94	0.06	0.07	0.14	
2,7-(BuOCO) ₂ -indolokarbasool	3.91	0.03	0.05	0.09	
1-(3-C ₅ H ₅ N-(CH ₂) ₃ -OCO)-3-fentüüluurea	3.74	0.02	0.04	0.08	
2-CH ₃ -CO-CH ₂ -OCO-indolokarbasool	3.66	0.03	0.05	0.10	
2-(4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -OCO)-indolokarbasool	3.65	0.08	0.09	0.18	
2-BuOCO-indolokarbasool	3.62	0.04	0.05	0.11	
2-C ₆ H ₅ -CH ₂ -OCO-indolokarbasool	3.51	0.04	0.06	0.11	
1,3-difentüüluurea	3.45	0.03	0.05	0.10	
Indolokarbasool	3.35	0.04	0.05	0.11	
2,9-(OCH ₃) ₂ -indolokarbasool	3.23	0.04	0.06	0.11	
1-Cl-indolokarbasool	3.08	0.08	0.09	0.18	

^a Kastikestega märgistatud $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtused on määratud UV-Vis meetodil. Solvent: UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste korral 0,5% (m/m) veesisaldusega dimetüülsulfoksiid, tuumamagnetresonants-spektromeetriliste mõõtmiste korral 0,5% (m/m) veesisaldusega deutereeritud dimetüülsulfoksiid. Absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on leitud skaala ankurdamisel indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse külge.

^b Esimesel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud. ^c Teisel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud; laiendmääramatus 95% usaldusnivool.

Bensoaatiooni seondumise skaala koostamiseks uuriti neljateistkümnet sünteetilist retseptormolekuli ning kõik 23 $\Delta\log K_{\text{ass}}$ väärtust leiti TMR-spektromeetrilistest mõõtmistest (Tabel 3). Bensoaadi skaala ulatuseks on 1,52 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalispärane parameeter $s = 0,002 \log K_{\text{ass}}$ ühikut.

Tabel 3. Bensoaatiooni seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	U^c (k=2)	$\Delta \log K_{\text{ass}}$
1,3-biskarbasolüülurea	4.14	0.01	0.05	0.09	
1,3-bisindolüülurea	4.07	0.01	0.05	0.09	-0.55
3,4,4'-Cl ₃ -difenüülurea	3.59	0.01	0.05	0.09	0.37 1.02 0.49 0.85
2,9-(BuOCO) ₂ -indolokarbasool	3.23	0.01	0.05	0.09	0.46
RM-18	3.18	0.01	0.05	0.09	
2,7-Cl ₂ -indolokarbasool	3.13	0.01	0.05	0.09	0.14 0.58 0.60
2-CH ₃ -CO-CH ₂ -OCO-indolokarbasool	3.05	0.01	0.05	0.09	1.30 0.82
2-(4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -OCO)-indolokarbasool	3.04	0.01	0.05	0.09	-0.47 -0.14 0.90 0.42
2-BuOCO-indolokarbasool	3.01	0.01	0.05	0.09	0.28 0.16
2-C ₆ H ₅ -CH ₂ -OCO-indolokarbasool	3.00	0.01	0.05	0.09	0.12 0.12 0.33 -0.23 0.42
1,3-difenüülurea	2.88	0.01	0.05	0.09	
Indolokarbasool	2.77	0.01	0.05	0.09	0.27
2,9-(OCH ₃) ₂ -indolokarbasool	2.69	0.01	0.05	0.09	
1-Cl-indolokarbasool	2.62	0.01	0.05	0.09	

^a Solvent: 0,5% (m/m) veesisaldusega deutereeritud dimetüülsulfoksiid. Absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on leitud skaala ankurdamisel indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse külge. ^b Esimesel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud. ^c Teisel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud; laiendmääramatus 95% usaldusnivool. Kõik juhusliku määramatuse efektid ümardati ülespoole.

Laktaatiooni seondumise skaala koostamiseks uuriti kuutteistkümmet sünteetilist retseptormolekuli ning kõik 27 $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtust leiti TMR-spektromeetristest mõõtmistest (Tabel 4). Laktaadi skaala ulatuseks on 1,43 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut ning kooskõlalisusparameeter $s = 0,02 \log K_{\text{ass}}$ ühikut.

Tabel 4. Laktaatiooni seondumise skaala.^a

Retseptormolekul	$\log K_{\text{ass}}$	u_c^b	u_c^c	U^c (k=2)	$\Delta \log K_{\text{ass}}$
1,3-biskarbasolüülurea	3.22	0.02	0.08	0.16	
1,3-bisindolüülurea	3.17	0.01	0.08	0.16	
3,4,4'-Cl ₃ -difenüülurea	2.86	0.01	0.08	0.16	0.55
2,9-(BuOCO) ₂ -indolokarbasool	2.52	0.01	0.08	0.15	
RM-18	2.51	0.02	0.08	0.16	-0.88
RM-19	2.47	0.02	0.08	0.16	0.97 1.00 0.13 -0.85 0.49 -0.08
2,7-Cl ₂ -indolokarbasool	2.44	0.01	0.08	0.15	
1-(3-C ₅ H ₅ N-(CH ₂) ₃ -OCO)-3-fenüülurea	2.44	0.01	0.08	0.15	1.10
2-CH ₃ -CO-CH ₂ -OCO-indolokarbasool	2.36	0.02	0.08	0.16	0.74 0.74 -0.39 0.21 0.14
2-BuOCO-indolokarbasool	2.35	0.01	0.08	0.16	0.32 0.37 0.33
2-(4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -OCO)-indolokarbasool	2.33	0.01	0.08	0.15	-0.13 0.24 0.21 -0.31 0.26 0.11
2-C ₆ H ₅ -CH ₂ -OCO-indolokarbasool	2.33	0.02	0.08	0.16	
1,3-difenüülurea	2.23	0.01	0.08	0.15	0.23 0.55
Indolokarbasool	2.14	0.01	0.08	0.15	0.45
2,9-(OCH ₃) ₂ -indolokarbasool	2.11	0.01	0.08	0.15	
1-Cl-indolokarbasool	1.79	0.01	0.08	0.15	

^a Solvent: 0,5% (m/m) veesisaldusega deutereeritud dimetüülsulfoksiid. Absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on leitud skaala ankurdamisel indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse külge. ^b Esimesel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud. ^c Teisel arvutusmeetodil leitud standardmääramatuste hinnangud; laiendmääramatus 95% usaldusnivool.

3.2. Indolokarbasooli absoluutse seondumise mõõtmine

Omistamaks uuritud sünteetilistele retseptoritele absoluutseid $\log K_{\text{ass}}$ väärtusi, peavad skaalad olema ankurdatud mõne sellise retseptormolekuli külge, mille absoluutne $\log K_{\text{ass}}$ on vastavas DMSO ja vee segus teada. Käesolevas töös valiti kõigi karboksülaatsioonide korral ankurpunktiks indolokarbasool, mille absoluutne $\log K_{\text{ass}}$ väärtus mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetrilisel meetodil iga aniooni suhtes vähemalt kolmel erineval päeval. Igal mõõtmisel saadud andmekomplektile rakendati kolme erinevat arvutusmeetodit [30]. Indolokarbasooli absoluutsed $\log K_{\text{ass}}$ väärtused erinevate karboksülaatsioonidega seondumisel on toodud Tabelis 5.

Tabel 5. Indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtused erinevate karboksülaatsioonide korral.

Anioon	Abs $\log K_{\text{ass}}^a$	s^b	n^b
Trimetüülatsetaatioon	3,35	0,05	3
Bensoaatioon	2,77 ^c	0,05	2
Laktaatsioon	2,14	0,08	5

^a $\log K_{\text{ass}}$ väärtused on sõltumatute mõõtmiste aritmeetilised keskmised.

^b Paralleelmõõtmiste standardhälbed ja korduste arvud. ^c $\log K_{\text{ass}}$ väärtus on määratud TMR meetodil doktorant S. Kadam'i poolt.

3.3. Absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramatuse hinnangud

Kooskõlalisusparameeter s kirjeldab $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste kokkusobivust ühe skaala ulatuses, kuid see ei väljenda üksikute retseptormolekulide $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtemääramatusi. Võimalikest kõrvalreaktsioonidest, aktiivsuskoeffitsientide määramisest ja kasutatud ainete ebapuhtusest tulenevaid mõõtemääramatusi on raske kvantiseerida [29] ning seetõttu oleks määramatuse hindamine klassikalisel ISO GUM meetodil keeruline. Töös kasutati üldisemat käsitlust, kus absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste määramatused leiti järgmise valemi järgi:

$$u_c(\log K_{\text{ass}}) = \sqrt{u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})^2 + u(\text{ankurdamine})^2 + u(\text{süsteem})^2} \quad (14)$$

, kus $u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})$ hindab $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste juhuslikke efekte, $u(\text{ankurdamine})$ väljendab juhuslikke efekte, mis tulenevad skaala ankurdamisest ning $u(\text{süsteem})$

väljendab ankurühendi ehk indolokarbasooli absoluutse $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse mõõtmisest põhjustatud süstemaatilisi efekte. $u(\sum \Delta \log K_{\text{ass}})$ on üksiku retseptormolekuli $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmiste standardhälve. Määramatuse komponendi $u(\text{ankurdamine})$ hinnanguna kasutame ankruaine absoluutsete K_{ass} väärtuste standardhälvet üle erinevate päevade ja erinevate arvutusmeetodite. Määramatuse komponendi $u(\text{süsteem})$ väärtuseks hinnati 0,03 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut, võttes arvesse meie töögrupi pikaajalist kogemust sarnaste mõõtmiste määramatuste hindamisel.

Absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtemääramatusi arvutati kahel viisil. Esimesel juhul arvestati ainult $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtuste mõõtmiste mõõtemääramatust selliselt, et võrrandi (14) teine ja kolmas liige võeti võrdseks nulliga. Teisel arvutusviisil kaasati ka skaala ankurdamisest tingitud juhuslikud efektid ja absoluutse $\log K_{\text{ass}}$ väärtuse määramise süstemaatilised efektid.

Esimese arvutusmeetodiga leitud mõõtemääramatused kirjeldavad, kui täpselt (kordustäpsuse mõistes, [38]) on võimalik suhtelise mõõtmismeetodiga $\log K_{\text{ass}}$ väärtusi mõõta ja on seega sobivad mõõtemääramatuste hinnangud samale skaalale kuuluvate erinevate ühendite $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste võrdlemiseks. Teise arvutusmeetodiga leitud mõõtemääramatused kirjeldavad, kui täpselt on kasutatud solvendis võimalik määrata absoluutseid seondumiskonstante ja on sobivad selles töös leitud absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste võrdlemiseks teiste töögruppide määratud absoluutsete seondumiskonstantidega. Absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste standardmääramatuste hinnangud on toodud iga skaala kolmandas ja neljandas tulbas (Tabel 2, Tabel 3 ja Tabel 4).

3.4. Uuritud retseptorite afiinsuste võrdlemine

3.4.1 Asendusrühmade mõju afiinsustele

Uuritud retseptorite hulka kuuluvate asendatud uureate ja indolokarbasoolide asendusrühmad mõjutavad karboksülaatioonide seondumist elektroonsete ja steeriliste efektide kaudu [17]. Kõigi eelduste kohaselt elektronaktseptoorsete rühmade lisamine soodustab retseptorite seondumist aniooniga, kuna vesiniksideme-donoorsete NH rühmade vesinikuaatomid on sel juhul tugevamini positiivselt polariseeritud ning vastavad rühmad seeläbi tugevamad vesiniksideme doonorid. Kõigil kolmel skaalal

on näha, et kloro- ja nitro-asendatud ühendite seondumisafiinsused on kõrgemad kui elektrondonoorsete asendajatega (nt metoksü-) ühenditel. Näiteks trimetüülatsetaadi skaalas on nitrorühmaga indolokarbasooli ja asendamata indolokarbasooli seondumistugevuste erinevus $0,72 \log K_{\text{ass}}$ ühikut ja bensoaadi skaalas on indolokarbasooli ja 2,7-Cl₂-indolokarbasooli seondumistugevuste erinevus $0,36 \log K_{\text{ass}}$ ühikut. Seevastu on karboksülaatioonide seondumine 1-Cl-indolokarbasooliga nõrgem kui indolokarbasooliga, sest elektronaktseptoorsed rühmad positsioonidel 1 ja 10, millel on negatiivne osalaeng, vähendavad anioonide seondumist seondumistsentris tekkiva laengute tõukumise ning samuti steerilise takistuse tõttu.

Resonantsmehhanismi tõttu käitub metoksü-rühm asendites 2 ja 9 elektronide doonorina, vähendades NH rühma vesiniku positiivset polarisatsiooni ja muutes NH rühma nõrgemaks vesiniksideme doonoriks. Seevastu induktsiooniefekti tõttu on metoksü-rühm elektronide aktseptor, tõstes NH rühma vesiniksideme-donoorset võimet. Nende kahe efekti kombinatsioonina resonants efekti võimaldab metoksü-asendusrühm indolokarbasool-retseptorite seondumistugevust oluliselt ei mõjuta ning seetõttu on indolokarbasooli ja 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasooli seondumisafiinsused sarnased.

Mõõtmistulemused kinnitavad, et lisades indolokarbasooli molekulile estersideme abil mahukamaid asendusrühmi, vastavate retseptorite afiinsus karboksülaatioonide suhtes suureneb. 2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasooli seondumine bensoaatiooniga on $0,46 \log K_{\text{ass}}$ ühiku võrra tugevam kui asendamata indolokarbasooliga.

3.4.2 Retseptorite afiinsus erinevate karboksülaatioonide suhtes

Süntetiliste retseptorite suhteliste afiinsuste muutused erinevate karboksülaatioonidega seondumisel on hästi jälgitavad Joonise 5 abil. Lisaks antud töös uuritud laktaat-, bensoaat- ja trimetüülatsetaatioonile on joonisele kantud ka meie töögrupis varasemalt mõõdetud atsetaatiooni absoluutsed seondumiskonstandid [31], mis on leitud samuti UV-Vis ja TMR suhtelisel mõõtmismeetodil, kasutades samu töötingimusi ja solventi. Joonisele 5 on kantud retseptorid, millele on omistatud seondumiskonstandid kõigi nelja aniooniga.

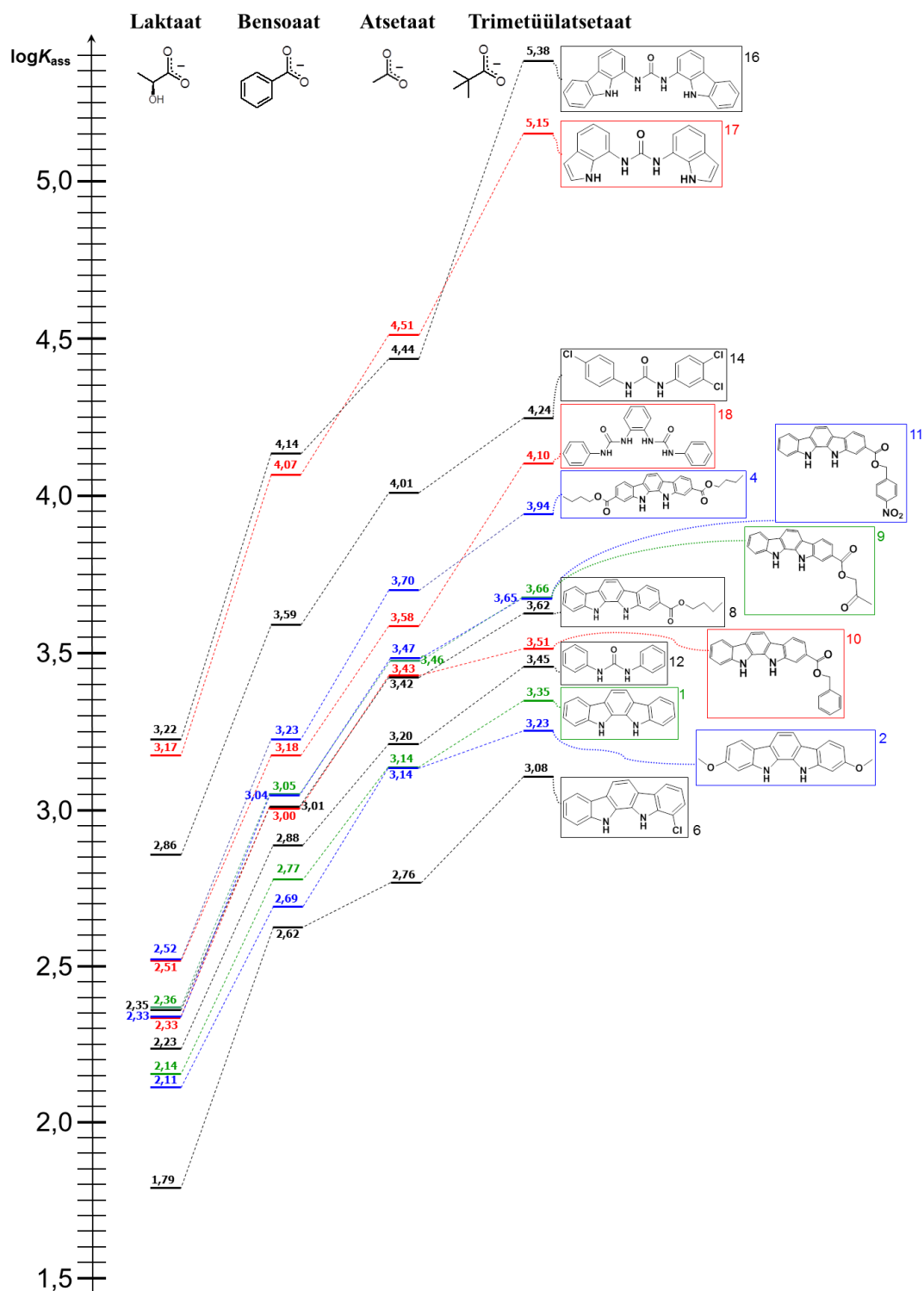
Mõõtmistulemused toetavad eeldust, et retseptorite afiinsused olenevad suuresti aniooni aluselisusest. Laktaatiooni kui kõige nõrgemate aluseliste omadustega aniooni seovad retseptorid üldiselt kõige nõrgemini ning trimetüülatsetaatiooni kui kõige

aluselisemat aniooni seovad retseptorid üldiselt kõige tugevamini. Kõigi anioonide korral on kõrgeima afiinsusega retseptormolekulid 1,3-biskarbasolüüluurea (**16**) ja 1,3-bisindolüüluurea (**17**). Enamikku anioone seob retseptor **16** veidi tugevamini, kuid atsetaatiooni seob tugevamini retseptor **17**. Karbasolüülrühm on indolüülrühmast hüdrofoobsem ja on võimalik, et esineb mõningane hüdrofoobne vastasmõju, mis toetab retseptori **16** ja hüdrofoobset saba omavate anioonide seondumist. Seda iseloomustab 1,3-biskarbasolüüluurea seondumine trimetüülatsetaadiga, kus võrreldes ühendiga **17** on seondumisafiinsus kõrgem 0,23 $\log K_{\text{ass}}$ ühikut.

Valides retseptorpaariks 2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasooli (**4**) ja RM-18 (**18**) on viimasel kõrgem afiinsus trimetüülatsetaatiooni suhtes. Seda seletab ühendi **18** suurem liikumisvabadus: fenüülrühmade roteerumine sobivasse asendisse stabiliseerib kompleksi trimetüülatsetaadiga nii hüdrofoobsete kui ka steeriliste efektide abil.

1-Cl-indolokarbasooli retseptormolekuli (**6**) seondumine atsetaatiooniga on madalam, kui võiks eeldada atsetaadi aluseliste omaduste järgi.

Retseptoritel **11** ja **9** on kõigi anioonide suhtes väga sarnased seondumisafiinsused. $\log K_{\text{ass}}$ väärtused erinevad vaid 0,03 kuni 0,01 ühikut. Samuti on retseptorite **8** ja **10** afiinsused sarnased, kuigi väike erinevus tekib trimetüülatsetaadi seondamisel, kus ühendi **8** teises positsioonis asuv elektronaktseptoorne hüdrofoobse sabaga BuOCO-rühm soodustab eelistatult just trimetüülatsetaadi seondumist.



Joonis 5. Sünteetiliste retseptorite afiinsuste muutused seondumisel laktaat-, bensoaat-, atsetaat- ja trimetiülatsetaatiooniga. Iga aniooni korral on ankurpunktiks indolokarbasooli $\log K_{\text{ass}}$ väärtus.

3.5. Kasutatud meetodi eelised ja rakendatavus

Käesolevas töös kasutatud suhteliste afiinsuste mõõtmismeetodil on mitmeid eeliseid võrreldes absoluutmõõtmistega. Retseptorite seondumiste erinevuste mõõtmine on absoluutmõõtmisest täpsem, sest selliselt mõõtes kaovad ära (taanduvad välja) mitmed määramatuse allikad, kuna nad mõjutavad mõlemat retseptormolekuli samas lahuses samal määral. Sellised on näiteks lahuses oleva retseptori solvatatsiooni- ja assotsiatsiooniastme ning kasutatava solvendi koostise muutused. Suhteliste afiinsuste mõõtmismeetodi töökindluse tõttu võimaldab see paremini võrrelda erinevates laborites määratud retseptor-anioon seondumiskonstante, seejuures ka nende konstantide väikesi erinevusi.

Koostatud skaalade väga head kooskõllalisused kinnitavad, et suhteline mõõtmismeetod on retseptor-anioon seondumiskonstantide leidmiseks edukalt rakendatav, kuna selliselt on võimalik eristada retseptoreid, mille seondumistugevuste erinevus on vähem kui $0,05 \log K_{\text{ass}}$ ühikut. Võrreldes absoluutmõõtmistega on see detekteeritav erinevus märgatavalt madalam.

Trimetüülatsetaatiooni skaala koostamisel kasutatud UV-Vis ja TMR mõõtmiste kooskõllalisus kinnitab mõlema meetodi sobivust suhtelise mõõtmismeetodi rakendamiseks ning võimaldab kahe meetodiga leitud seondumiskonstante kanda ühele skaalale. Sama järelduseni jõuti ka atsetaatiooni uurimustöös [31], mis kinnitab, et vaatamata kasutatavate kontsentratsioonide erinevusele, pole suhtelise mõõtmise korral praktiliselt oluline, kumba meetodit suhteliste seondumiskonstantide leidmiseks kasutatakse.

TMR meetodiga võrreldes, võimaldab UV-Vis meetodi kõrgem tundlikkus kasutada seondumiskonstantide mõõtmisel väiksemaid ainete koguseid ja madalamaid kontsentratsioone. UV-Vis meetodi kasutamiseks on vajalik valida solvent, mis ei oma uuritavas lainelas neelduvust ning kromofoorse rühmaga retseptorid, mille spekter aniooniga seondumisel muutub. Samas TMR meetodiga ei pea registreerima puhaste ainete spektreid ning korraga saab mõõta rohkem kui kahe retseptori suhtelist afiinsust. TMR meetodi eelisteks on ka arvutusmeetodi lihtsus ning võimalus jälgida erinevaid kõrvalprotsesse. Skaalade kooskõllalisusparameetrid kinnitavad, et TMR meetodiga on võimalik seondumiskonstante täpsemalt määrata.

Süntetiliste retseptorite seondumisskaalade koostamine lihtsamatele karboksülaatioonidele

Kerli Martin

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata rea lihtsate sünteetiliste retseptormolekulide seondumisafiinsused kolme struktuurset erineva karboksülaatiooni suhtes, kasutades suhtelist mõõtmismeetodit, mis võimaldab eristada retseptoreid, millel on lähedane afiinsus uuritava aniooni suhtes. Sünteetiliste retseptorite kooskõlalised seondumisskaalad koostati trimetüülatsetaat-, bensoaat- ja laktaatioonile. Seondumisafiinsuste erinevusi ($\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtusi) mõõdeti spektrofotomeetrilise (UV-Vis meetod) ja tuumamagnetresonants-spektromeetrilise (TMR meetod) tiitrimise meetoditega.

UV-Vis ja TMR meetodeid rakendati erinevate indolokarbasooli- ja urea-põhiste retseptorite suhteliste seondumistugevuste mõõtmiseks vastavalt 0,5% veesisaldusega dimetüülsulfoksiidis või 0,5% veesisaldusega deutereeritud dimetüülsulfoksiidis. Trimetüülatsetaatiooni seondumisafiinsust mõõdeti mõlema meetodiga ja koostatud skaala katab $\log K_{\text{ass}}$ vahemikku 3,1 kuni 5,4 kooskõlalisusparameetriga $s = 0,05 \log K_{\text{ass}}$ ühikut, mis näitab head kooskõla TMR ja UV-Vis mõõtmiste vahel. Bensoaatiooni seondumisafiinsust mõõdeti TMR meetodiga ja koostatud skaala katab $\log K_{\text{ass}}$ vahemikku 2,6 kuni 4,2 kooskõlalisusparameetriga $s = 0,002 \log K_{\text{ass}}$ ühikut, mis demonstreerib TMR meetodi kõrget täpsust. Laktaatiooni seondumisafiinsust mõõdeti TMR meetodiga ja koostatud skaala katab $\log K_{\text{ass}}$ vahemikku 1,8 kuni 3,2 kooskõlalisusparameetriga $s = 0,02 \log K_{\text{ass}}$ ühikut, mis näitab head kooskõla erinevate $\Delta \log K_{\text{ass}}$ mõõtmiste vahel. Absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste leidmiseks ankurdati skaalad vahetult mõõdetud asendamata indolokarbasooli absoluutsete $\log K_{\text{ass}}$ väärtuste külge.

Koostatud skaalad näitavad mõõtmistulemuste väga head kooskõlalisust ja kinnitavad, et suhteliste seondumisafiinsuste mõõtmise meetod sobib sünteetiliste retseptorite seondumiskonstantide määramiseks.

Building Binding Scales of Simple Carboxylate anions by Synthetic Receptors

Kerli Martin

Summary

The aim of this work was to determine binding affinities of a number of simple synthetic molecular receptors for three carboxylate anions of different structure using relative binding affinity measurement method which enables differentiating between receptors having similar binding affinities towards a particular anion. Self-consistent scales of binding of trimethylacetate ion, benzoate ion and lactate ion by different synthetic receptors were constructed. Differences in binding affinities ($\Delta \log K_{\text{ass}}$ values) were measured using spectrophotometric (UV-Vis method) and nuclear magnetic resonance spectrometric (NMR method) titration approaches.

UV-Vis and NMR methods were applied for the binding strength measurement of different indolocarbazole-based and urea-based receptors towards three carboxylate ions in dimethyl sulfoxide containing 0.5% of water or deuterated dimethyl sulfoxide containing 0.5% water, respectively. Trimethylacetate binding affinity was measured using both methods and the constructed scale covers a range from 3.1 to 5.4 $\log K_{\text{ass}}$ units with consistency parameter $s = 0.05 \log K_{\text{ass}}$ units, which shows good agreement between the measurement results obtained using NMR and UV-Vis technique. Benzoate binding affinity was measured using the NMR method and the constructed scale covers a range from 2.6 to 4.2 $\log K_{\text{ass}}$ units with consistency parameter $s = 0.002 \log K_{\text{ass}}$ units, which demonstrates the high precision of the NMR method. Lactate binding affinity was measured using NMR method and constructed scale covers a range from 1.8 to 3.2 $\log K_{\text{ass}}$ units with consistency parameter $s = 0.02 \log K_{\text{ass}}$ units, which shows good consistency between different $\log K_{\text{ass}}$ value measurements. Absolute $\log K_{\text{ass}}$ values were determined by anchoring the scale to directly measured $\log K_{\text{ass}}$ values of unsubstituted indolocarbazole.

The constructed scales indicate high consistency of the results and confirm the suitability of the relative binding approach for the determination of binding affinities of synthetic receptors towards anions.

Kasutatud kirjandus

1. Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2007.
2. Reichardt, C. *Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3rd ed; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2003.
3. Lehn, J-M. Supramolecular Chemistry and Self-assembly Special Feature: Toward Complex Matter: Supramolecular Chemistry and Self-Organization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2002**, 99, 4763-4768.
4. Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2009.
5. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, 44(2), 98-104.
6. Pirodini, L.; Dalcanale, E. Molecular Recognition at the Gas-Solid Interface: a Powerful Tool for Chemical Sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36-695.
7. Pinalli, R.; Dalcanale, E. Supramolecular Sensing with Phosphonate Cavitands. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 399-411.
8. Cram, D. J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes. *Science*, **1988**, 240, 760-767.
9. Lehn, J-M. Toward Self-Organization and Complex Matter. *Science*, **2002**, 295, 2400-2401.
10. Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 697-699.
11. Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. Sensing A Paradigm Shift in the Field of Molecular Recognition: From Selective to Differential Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3118-3130.
12. Hierlemann, A.; Ricco, A. J.; Bodenhöfer, K.; Göpel, W. Effective Use of Molecular Recognition in Gas Sensing: Results from Acoustic Wave and in situ FT-IR Measurements. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3022.
13. Berryman, O. B.; Bryantsev, V. S.; Stay, D. P.; Johnson, D. W.; Hay, B. P. Structural Criteria for the Design of Anion Receptors: The Interaction of Halides with Electron-Deficient Arenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 48-58.
14. Antonisse, M. M. G.; Reinhoudt, D. N. Neutral Anion Receptors: Design and Application. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 443-448.

15. Antonisse, M. M. G.; Snellink-Ruël, B. H. M.; Yigit, I.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. Neutral Anion Receptors: Synthesis and Evaluation as Sensing Molecules in Chemically Modified Field Effect Transistors. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9034-9038.
16. Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Taglietti, A. *Anion Coordination Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
17. Fitzmaurice, R. J.; Kyne, G. M.; Douheret, D.; Kilburn, J. D. Synthetic Receptors for Carboxylic Acids and Carboxylates. *J. Chem. Soc.* **2002**, 841-864.
18. Gale, P. Synthetic Indole, Carbazole, Biindole and Indolocarbazole-based Receptors: Applications in Anion Complexation and Sensing. *Chem. Comm.* **2008**, 4525-4540.
19. Curiel, D.; Cowley, A.; Beer, P. D. Indolocarbazoles: A New Family of Anion Sensors. *Chem. Comm.* **2005**, 236-238.
20. Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L. Anion Recognition by Hydrogen Bonding: Urea-Based Receptors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 3889-3915.
21. Smith, P. J.; Reddington, M. V.; Wilcox, C. S. Ion Pair Binding by a Urea in Chloroform Solution. *Tetrahedron Letters.* **1992**, 6085-6088.
22. Fan, E.; Van Arman, S. A.; Kincaid, S.; Hamilton, A. D. Molecular Recognition: Hydrogen-Bonding Receptors That Function in Highly Competitive Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (1), 369-370.
23. Smithrud, D. B.; Sanford, E. M.; Chao, I.; Ferguson, S. B.; Carcanague, D. R.; Evanseck, J. D.; Houk, K. N.; Diederich, F. Solvent effects in molecular recognition. *Pure & Appl. Chem.* **1990**, *62*, 2227-2236.
24. Boyle, E. M.; McCabe, T.; Gunnlaugsson, T. Synthesis, Photophysical and NMR Evaluations of Thiourea-based Anion Receptors Possessing Anacetamide Moiety. *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 586-597.
25. Anzenbacher, P.; Palacios, M. A.; Jursiková, K.; Marquez, M. Simple Electrooptical Sensors for Inorganic Anions. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5027-5030.
26. Schalley, A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; Wiley-VCH, Weinheim, 2012; pp 32-33.
27. Sessler, J. L.; Gross, D. E.; Cho, W.-S.; Lynch, V. M.; Schmidtchen, F. P.; Bates, G. W.; Light, M. E.; Gale, P. A. Calix[4]pyrrole as a Chloride Anion Receptor: Solvent and Countercation Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12281-12288.

28. Kütt, A.; Leito, I.; Kaljurand, I.; Sooväli, L.; Vlasov, V. M.; Yagupolskii, L. M.; Koppel, I. A. A Comprehensive Self-consistent Spectrophotometric Acidity Scale of Neutral Brønsted Acids in Acetonitrile. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2829-2838.
29. Sooväli, L.; Kaljurand, I.; Kütt, A.; Leito, I. Uncertainty Estimation in Measurement of pKa Values in Nonaqueous Media: A Case Study on Basicity Scale in Acetonitrile Medium. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *566*, 290-303.
30. Haav, K.; Kadam, S. A.; Toom, L.; Gale, P.; Busschaert, N.; Wenzel, M.; Hiscock, J. R.; Kirby, I. L.; Haljasorg, T.; Lõkov, M.; Leito, I. Accurate Method To Quantify Binding in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7796-7808.
31. Kadam, S. A.; Haav, K.; Toom, L.; Haljasorg, T.; Leito, I. NMR Method for Simultaneous Host-Guest Binding Constant Measurement. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2501-2513.
32. Eblinger, F.; Schneider, H.-J. Self-Association of Water and Water-Solute Associations in Chloroform Studied by NMR Shift Titrations. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5533-5537.
33. Freire, E.; Mayorga, O.L.; Straume, M. Isothermal Titration Calorimetry. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 950-959.
34. Edwards, P. R.; Hiscock, J. R.; Gale, P. A. Stabilisation of Alkylcarbamate Anions Using Neutral Hydrogen Bond Donors. *Tetrahedron Letters.* **2009**, 4922-4924.
35. Nishiyabu, R.; Anzenbacher, P. Sensing of Antipyretic Carboxylates by Simple Chromogenic Calix[4]pyrroles. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8270-8271.
36. Liu, Y.; Minami, T.; Nishiyabu, R.; Wang, Z.; Anzenbacher, P. Jr. Sensing of Carboxylate Drugs in Urine by a Supramolecular Sensor array. **2013**, *135*, 7705-7712.
37. Leito, I.; Raamat, E.; Kütt, A.; Saame, J.; Kipper, K.; Koppel, I. A.; Koppel, I.; Zhang, M.; Mishima, M.; Yagupolskii, L. M.; Garlyauskayte, R. Yu.; Filatov, A. A. Revision of the Gas-Phase Acidity Scale below 300 kcal mol⁻¹. *J. Phys. Chem. A.* **2009**, *113*, 8421-8424.
38. Leito, I.; Viitak, A. *Kvaliteeditagamine analüütilises keemias*, Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus, Tallinn, 2007.

4. Lisad

Lisa 1. UV-Vis spektrofotomeetrilise tiitrimise arvutusmeetodid.

UV-Vis spektrofotomeetrilisel tiitrimisel on retseptorite R_1H ja R_2H seondumised aniooniga tasakaalulised protsessid (võrrand 1) ning spektrite andmetest saab leida mõlema kompleksi dissotsiatsioonimäärad valemiga (9). Solvent võrdlusküvetis kompenseerib solvendist põhjustatud neelduvuse ning A^λ võtab arvesse, et optiline teepikkus l on kõigi ühendite jaoks sama. Retseptoritele arvutatakse $\Delta \log K_{\text{ass}}$ väärtus igas tiitrimispunktis.

Lambert-Beer'i reegli järgi on ühikulise optilise teepikkuse korral lainepikkusel λ ühendi X neelduvus väljendatav valemiga:

$$A_X^\lambda = \varepsilon_X^\lambda [X] \quad (15)$$

, kus ε_X^λ on ühendi X molaarne neeldumistegur lainepikkusel λ ja $[X]$ on ühendi X kontsentratsioon lahuses. Olukorras, kus lahuses on kaks osaliselt dissotsieerunud retseptor-anioon kompleksi R_1HA^- ja R_2HA^- ning kui anioon lainepikkusel λ valgust ei neela, on neelduvus avaldatav järgmiselt:

$$\begin{aligned} A^\lambda = & \varepsilon^\lambda(R_1HA^-)[R_1HA^-] + \varepsilon^\lambda(R_1H)[R_1H] + \\ & + \varepsilon^\lambda(R_2HA^-)[R_2HA^-] + \varepsilon^\lambda(R_2H)[R_2H] \end{aligned} \quad (16)$$

Teades, et retseptori summaarne kontsentratsioon lahuses on vaba retseptori ja retseptor-anioon kompleksi kontsentratsioonide summa ning võttes selle ühikuliseks suuruseks, saab retseptor-anioon komplekside tasakaalulisi kontsentratsioone avaldada valemitega:

$$[R_1HA^-] = 1 - [R_1H]$$

$$[R_2HA^-] = 1 - [R_2H] \quad (17)$$

Seejärel saab avaldada võrrandi (16) muudetud kujul:

$$A^\lambda = \varepsilon^\lambda (R_1 HA^-) + \varepsilon^\lambda (R_2 HA^-) + [\varepsilon^\lambda (R_1 H) - \varepsilon^\lambda (R_1 HA^-)] [R_1 H] + \\ + [\varepsilon^\lambda (R_2 H) - \varepsilon^\lambda (R_2 HA^-)] [R_2 H] \quad (18)$$

Kui lahuses on ainult vaba retseptor, siis valem (18) lihtsustub:

$$A^\lambda = [R_1 H] \varepsilon^\lambda (R_1 H) + [R_2 H] \varepsilon^\lambda (R_2 H) \quad (19)$$

Selle võrrandi paremat poolt saab avaldada vaba retseptorina esinevate puhaste ühendite neelduvuste korrutamisel koefitsientidega c_1 ja c_2 , mis on vastavalt segus olevate $R_1 H$ ja $R_2 H$ kontsentratsioonide ja puhaste ühendite lahuste kontsentratsioonide suhted. Olukorras, kus kumbki retseptor pole trimetüülatsetaadiga seotud, on $[R_1 H] = 1$ ja $[R_2 H] = 1$ ning ε^λ väärtuseid saab arvutada järgmiselt:

$$\varepsilon^\lambda (R_1 H) = c_1 A^\lambda (R_1 H_{\text{puh}}) \quad (20)$$

$$\varepsilon^\lambda (R_2 H) = c_2 A^\lambda (R_2 H_{\text{puh}}) \quad (21)$$

Eeldusel, et $\varepsilon^\lambda \neq 0$, on koefitsiendid c_1 ja c_2 kogu lainepikkuste vahemikus konstantsed. Kombineerides valemid (19), (20) ja (21), saab c_1 ja c_2 arvutada ühendite segu vaba retseptorvormi spektrist ja mõlema retseptori puhta ühendi vaba retseptorvormi spektrist, minimeerides valitud lainepikkuste vahemikus vähimruutude summat:

$$S_p = \sum_\lambda [A^\lambda - c_1 A^\lambda (R_1 H_{\text{puh}}) - c_2 A^\lambda (R_2 H_{\text{puh}})]^2 \quad (22)$$

Kui mõlemad retseptorid on trimetüülatsetaadiga täielikult komplekseerunud, siis sarnaselt valemile (19), saab segu neeldumise avaldada valemiga:

$$A^\lambda = [R_1 HA^-] \varepsilon^\lambda (R_1 HA^-) + [R_2 HA^-] \varepsilon^\lambda (R_2 HA^-) \quad (23)$$

Sarnaselt eelnevale, kui retseptormolekulid on lahuses ainult retseptor-anioon kompleksi kujul, saab võrrandi (23) parema poole avaldada selliselt:

$$\varepsilon^{\lambda} \left(R_1 HA^- \right) = c_1 A^{\lambda} (R_1 HA^-_{\text{puh}}) \quad (24)$$

$$\varepsilon^{\lambda} \left(R_2 HA^- \right) = c_2 A^{\lambda} (R_2 HA^-_{\text{puh}}) \quad (25)$$

Kasutades valemeid (9), (20), (21), (24) ja (25) saab järgnevalt valemisse (18) sisse tuua retseptor-anioon kompleksidele $R_1 HA^-$ ja $R_2 HA^-$ vastavad dissotsiatsioonimäärad α_1 ja α_2 , kontsentratsioonide suhted c_1 ja c_2 ning ühendite puhaste vormide neelduvused:

$$\begin{aligned} A^{\lambda} = & c_1 A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) + c_2 A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) + \alpha_1 c_1 \left[A^{\lambda} (R_1 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] + \\ & + \alpha_2 c_2 \left[A^{\lambda} (R_2 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] \end{aligned} \quad (26)$$

α_1 ja α_2 arvutamiseks saab võrrandi (26) kirjutada kahe-parameetrilise lineaarse regressiooni mudeli kujul järgmiselt:

$$\begin{aligned} A^{\lambda} - c_1 A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) - c_2 A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) = & \alpha_1 c_1 \left[A^{\lambda} (R_1 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] + \\ & + \alpha_2 c_2 \left[A^{\lambda} (R_2 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] \end{aligned} \quad (27)$$

α_1 ja α_2 arvutamiseks valitud lainepikkuste vahemikus aniooni erinevate kontsentratsioonide korral kasutatakse neelduvuste vahede ruutude summa minimeerimist vastavalt järgmisele võrrandile:

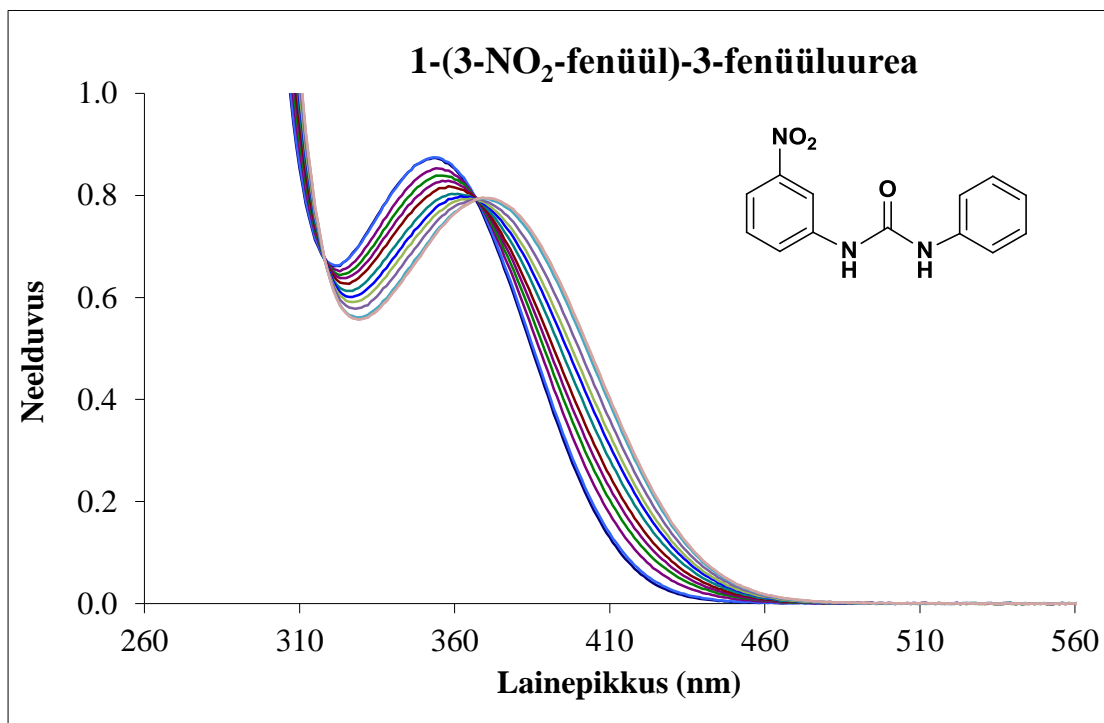
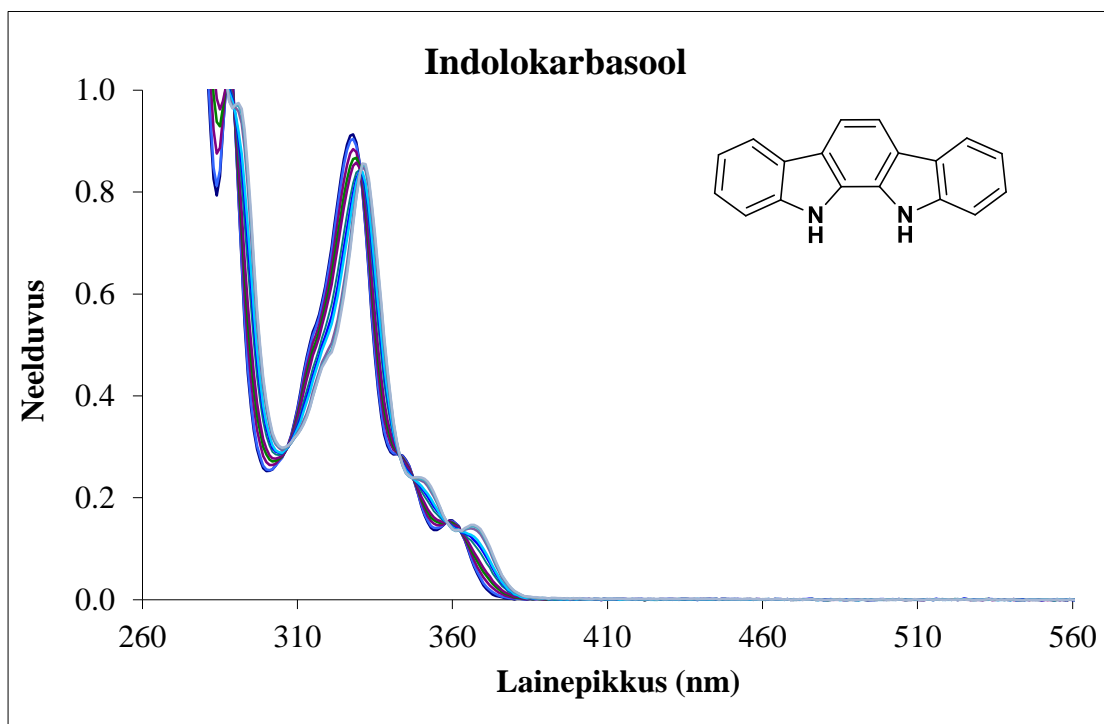
$$\begin{aligned} S_s = & \sum_{\lambda} \left\{ A^{\lambda} - c_1 A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) - c_2 A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) - \right. \\ & \left. - \alpha_1 c_1 \left[A^{\lambda} (R_1 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_1 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] - \alpha_2 c_2 \left[A^{\lambda} (R_2 H_{\text{puh}}) - A^{\lambda} \left(R_2 HA^-_{\text{puh}} \right) \right] \right\}^2 \end{aligned} \quad (28)$$

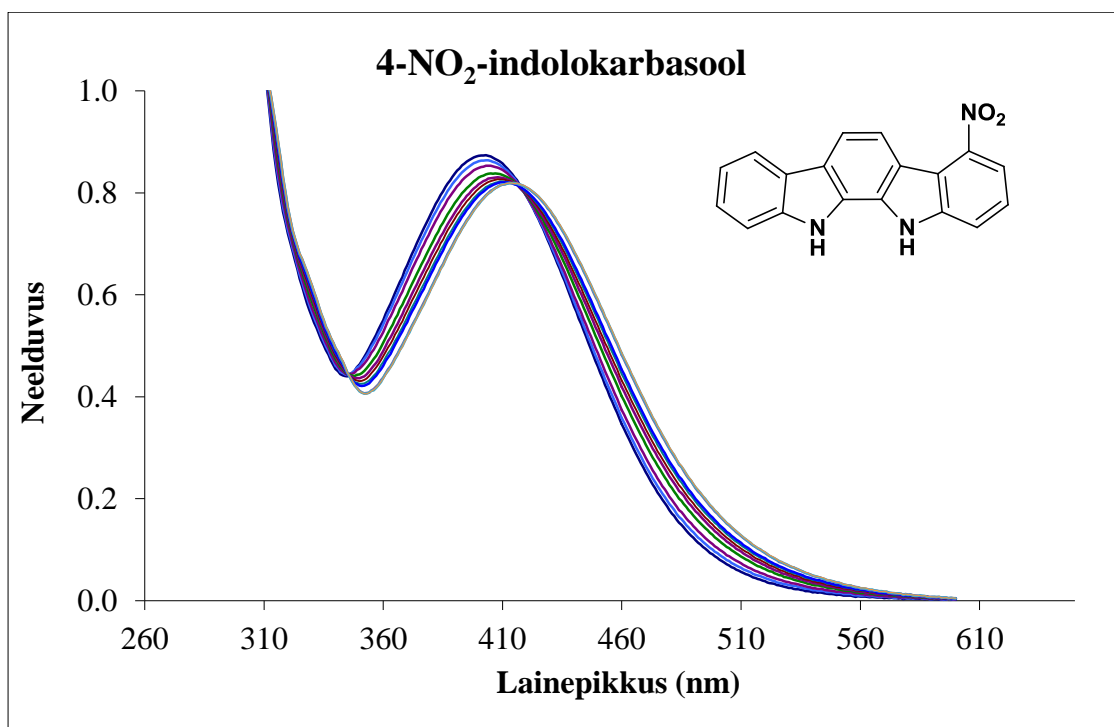
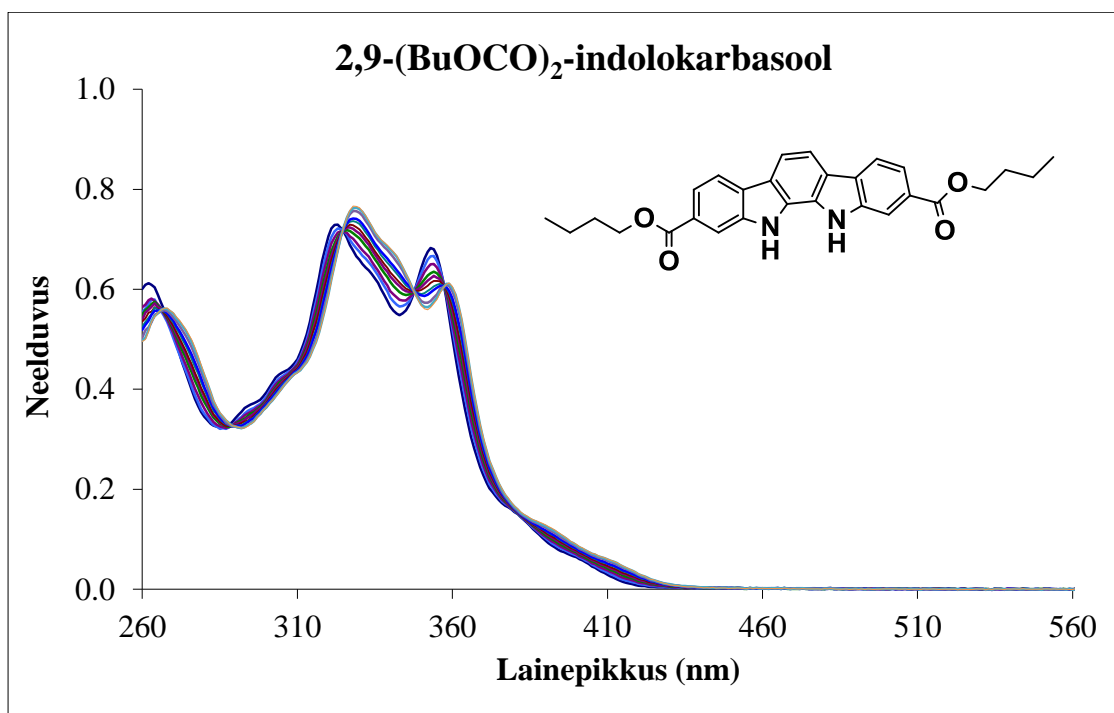
Lisades eelnevale valemile vabaliikme b_0 , saadakse kolme-parameetrilise lineaarse regressiooni mudel:

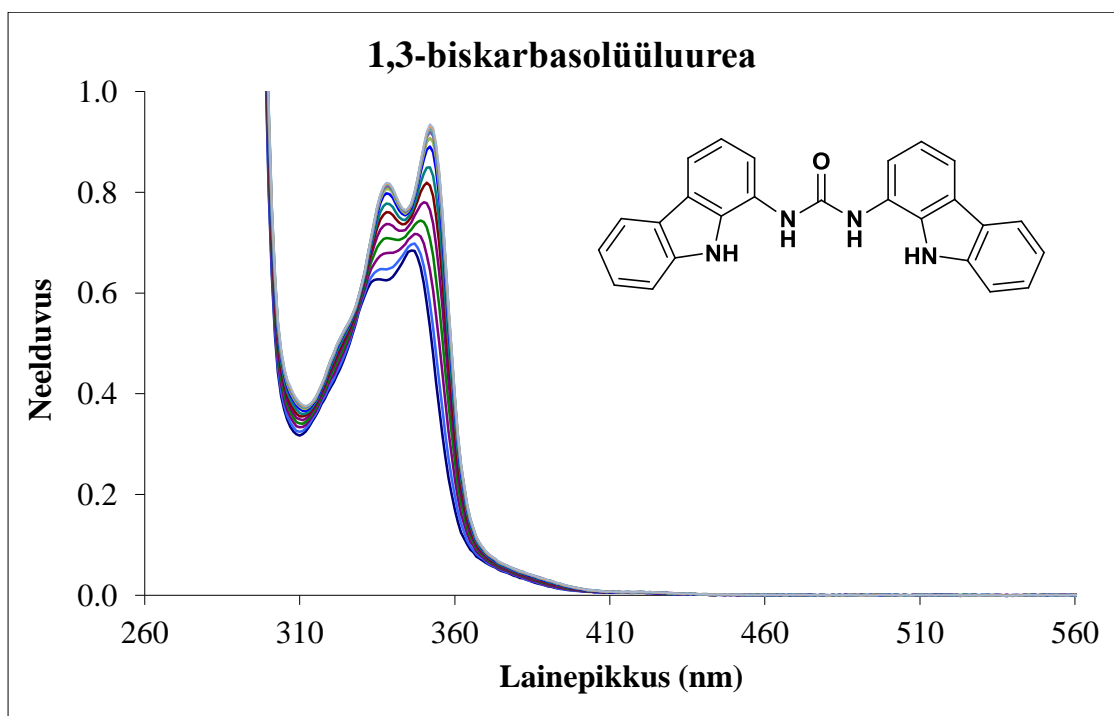
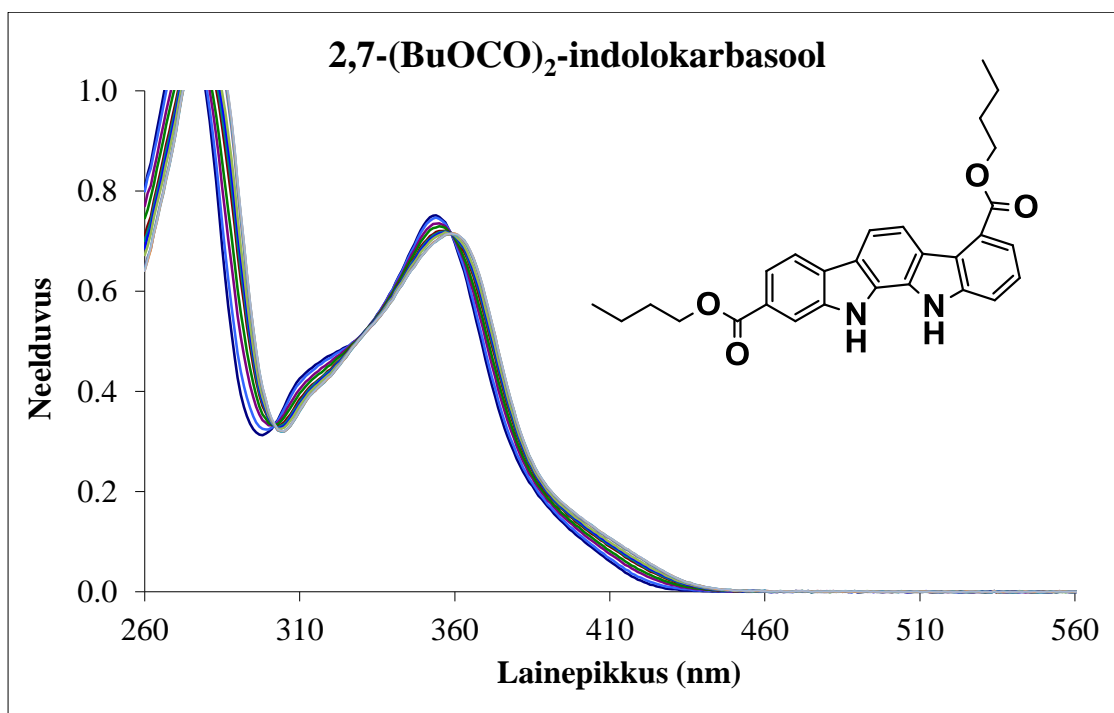
$$A^\lambda - c_1 A^\lambda(R_1 HA^-_{puh}) - c_2 A^\lambda(R_2 HA^-_{puh}) = \alpha_1 c_1 [A^\lambda(R_1 H_{puh}) - A^\lambda(R_1 HA^-_{puh})] + \\ + \alpha_2 c_2 [A^\lambda(R_2 H_{puhas}) - A^\lambda(R_2 HA^-_{puhas})] + b_0 \quad (29)$$

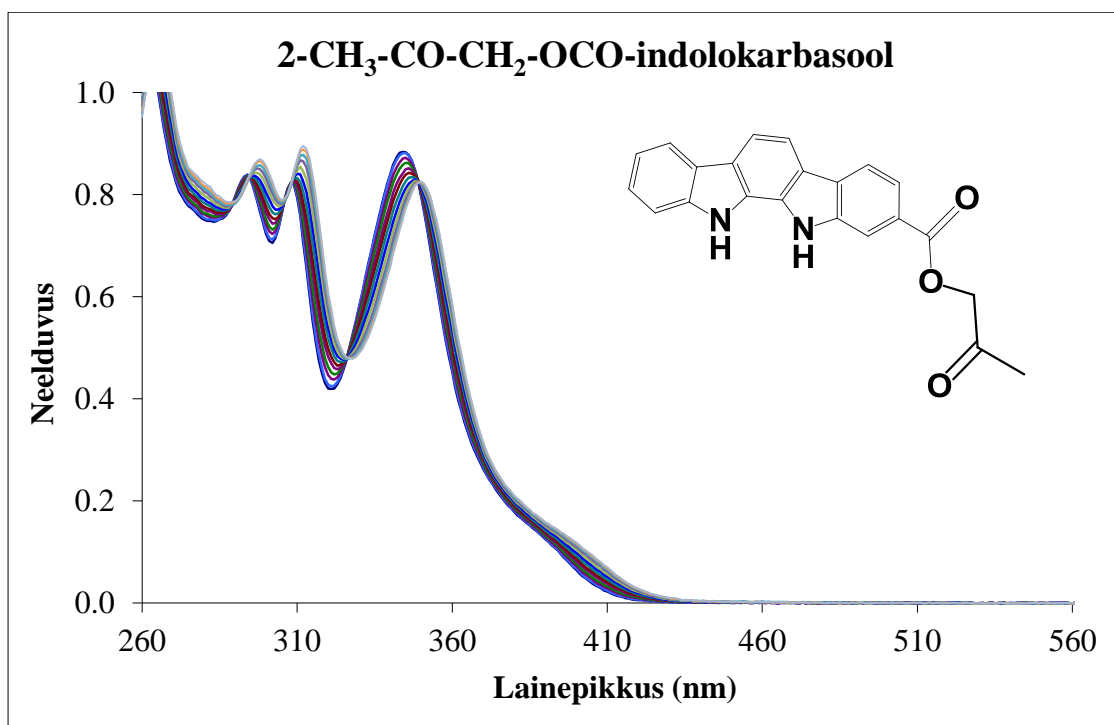
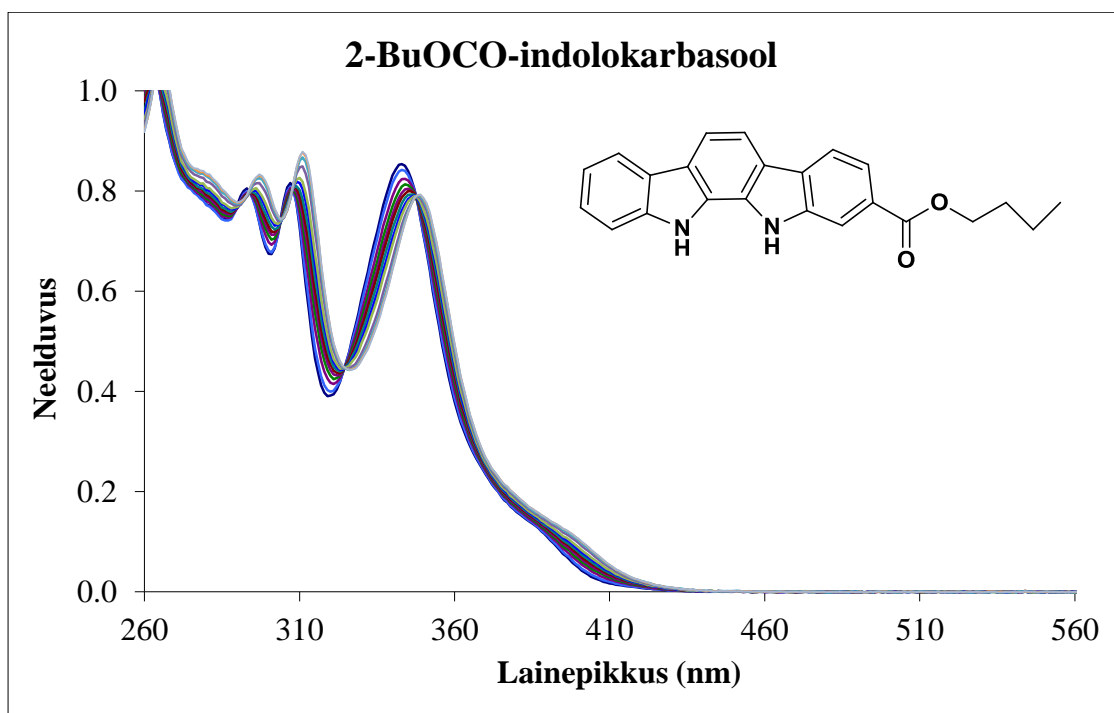
Arvutused võrranditega (27) ja (29) annavad üldjuhul sarnaseid tulemusi. Võrrand (29) võimaldab arvesse võtta ka puhta ühendi ja segu spektri mõõtmiste vahel tekkivat baasijoone nihkumist. Leitud dissotsiatsioonimäärasid α_1 ja α_2 kasutades saab $\Delta \log K_{ass}$ väärtuse arvutada valemiga (10).

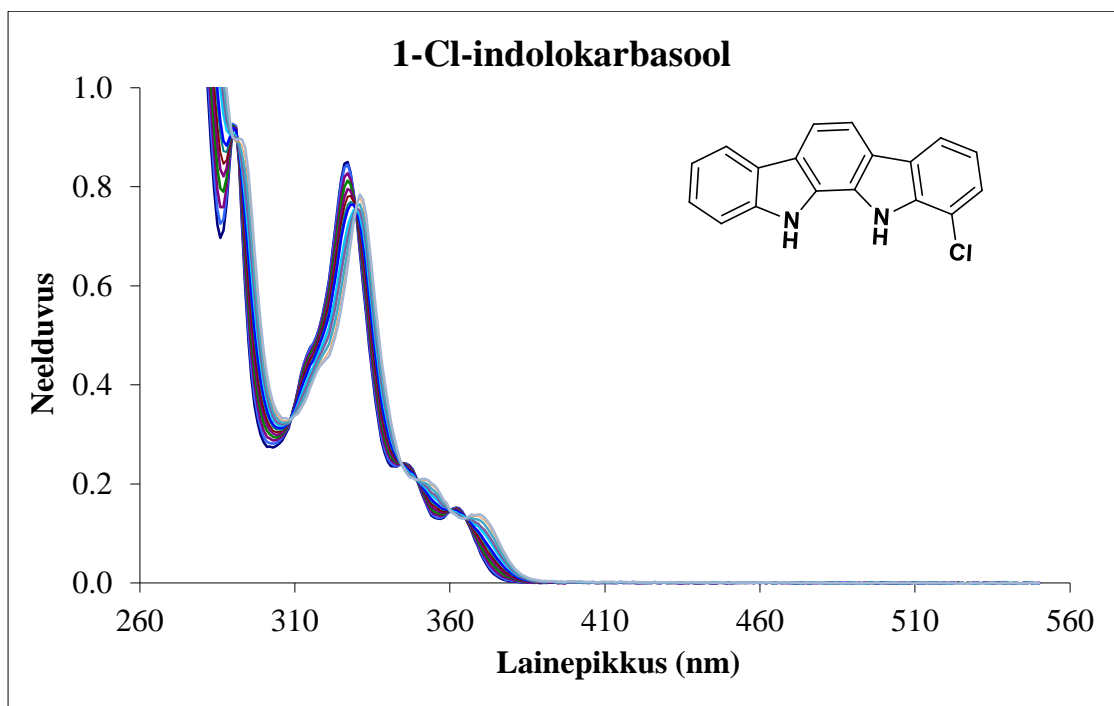
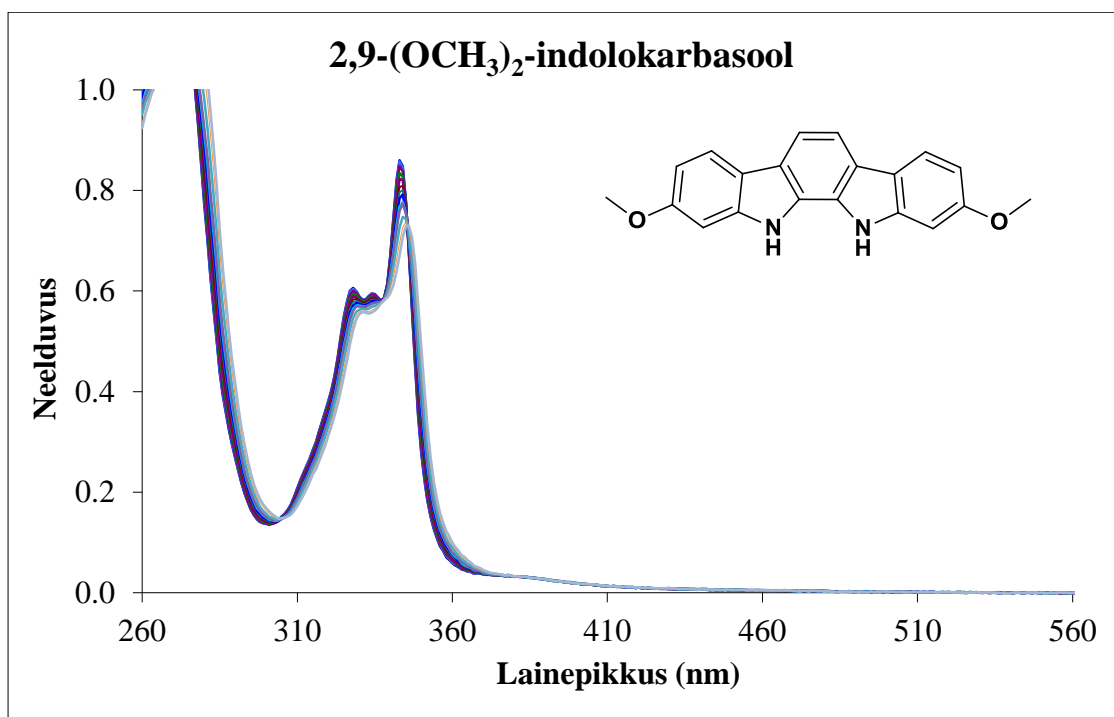
Lisa 2. Ühendite UV-Vis tiitrimise spektrid.

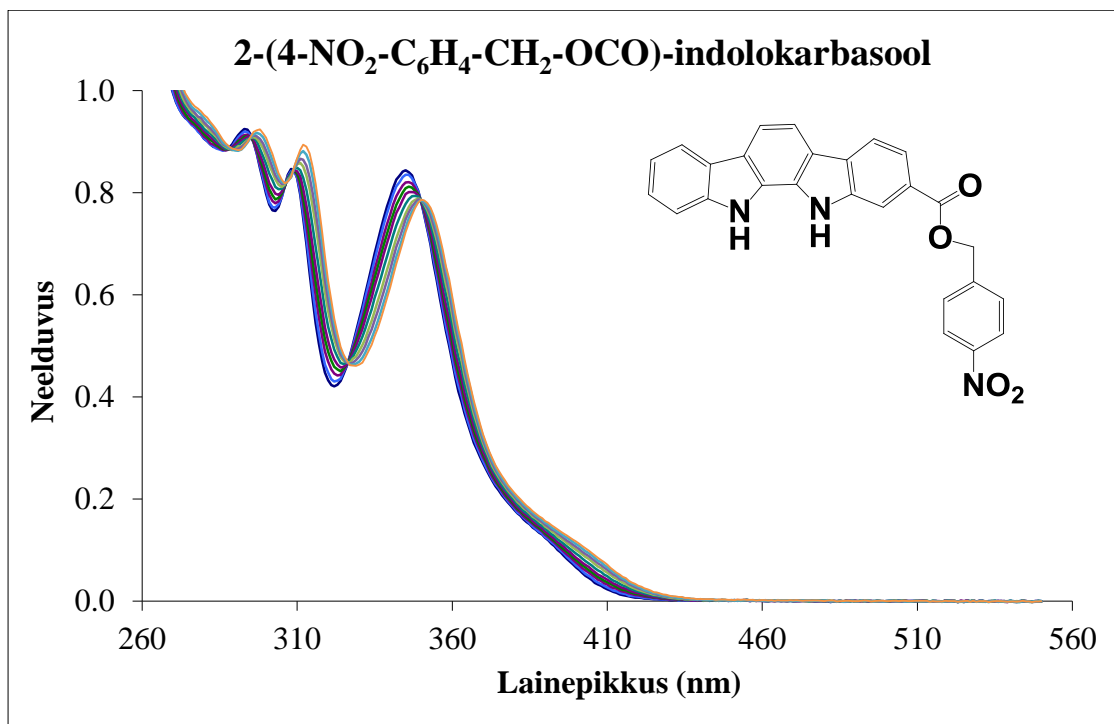
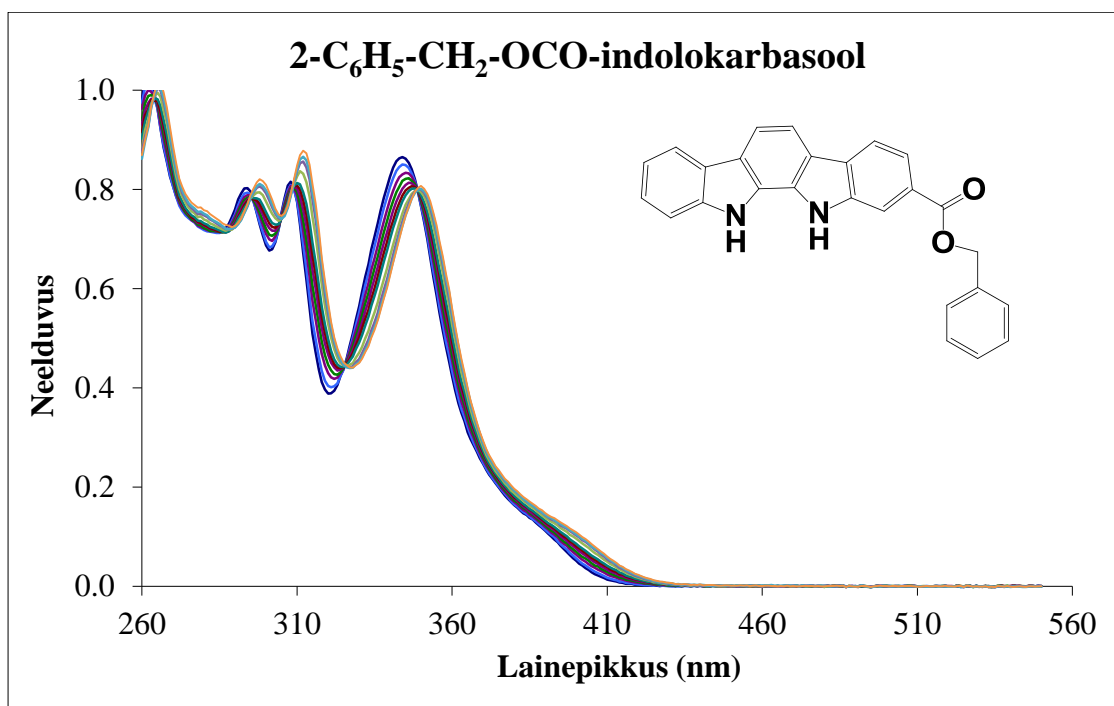






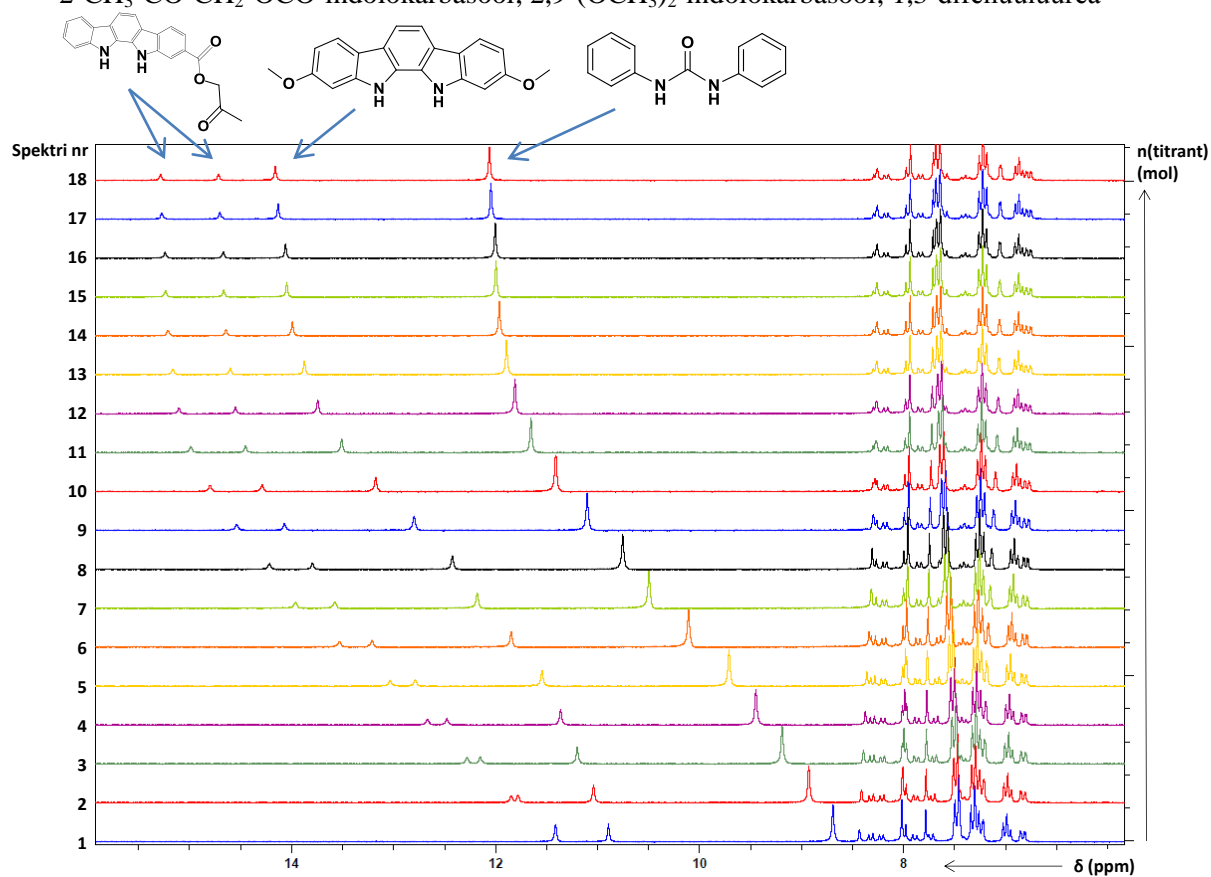




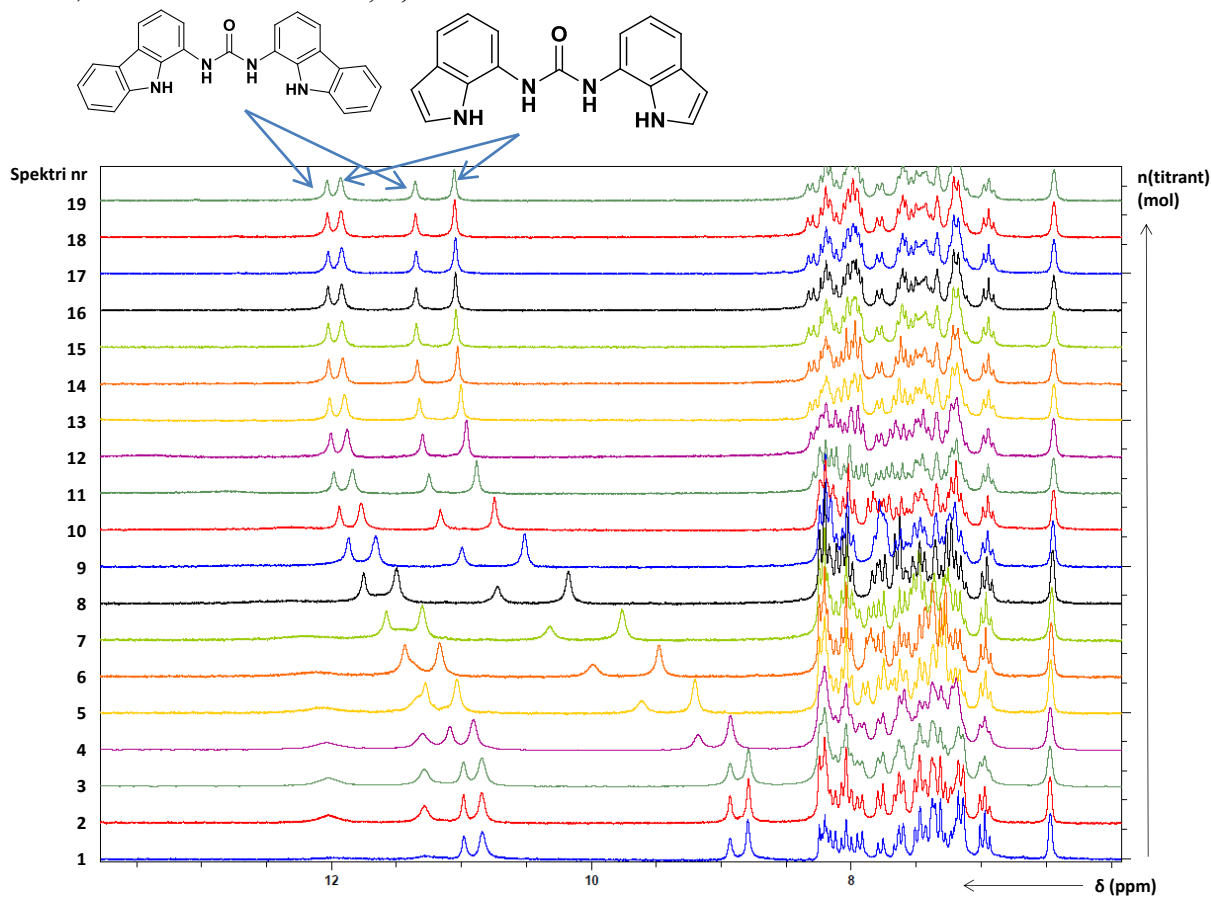


Lisa 3a. Trimetülatsetaadi TMR tiitrimise spektrid.

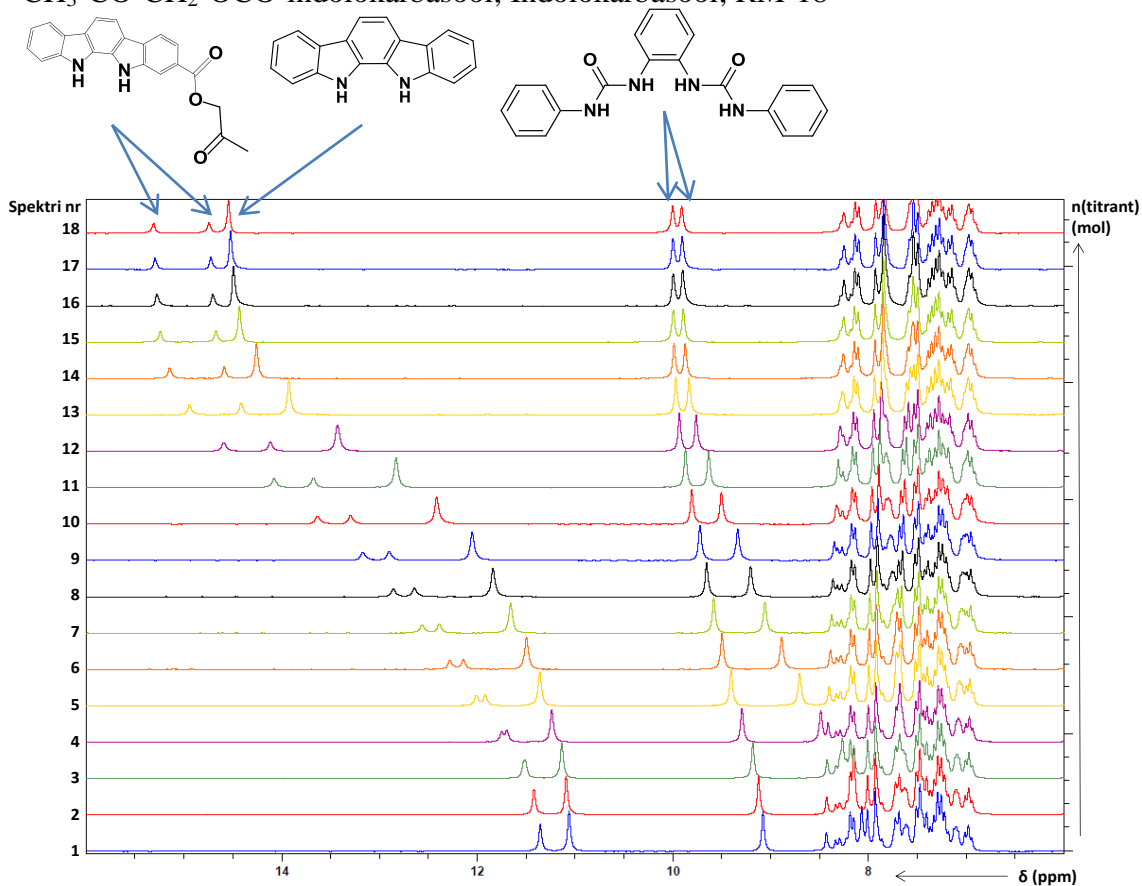
2-CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool; 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool; 1,3-difenüüluurea



1,3-biskarbasolüüluurea; 1,3-bisindolüüluurea

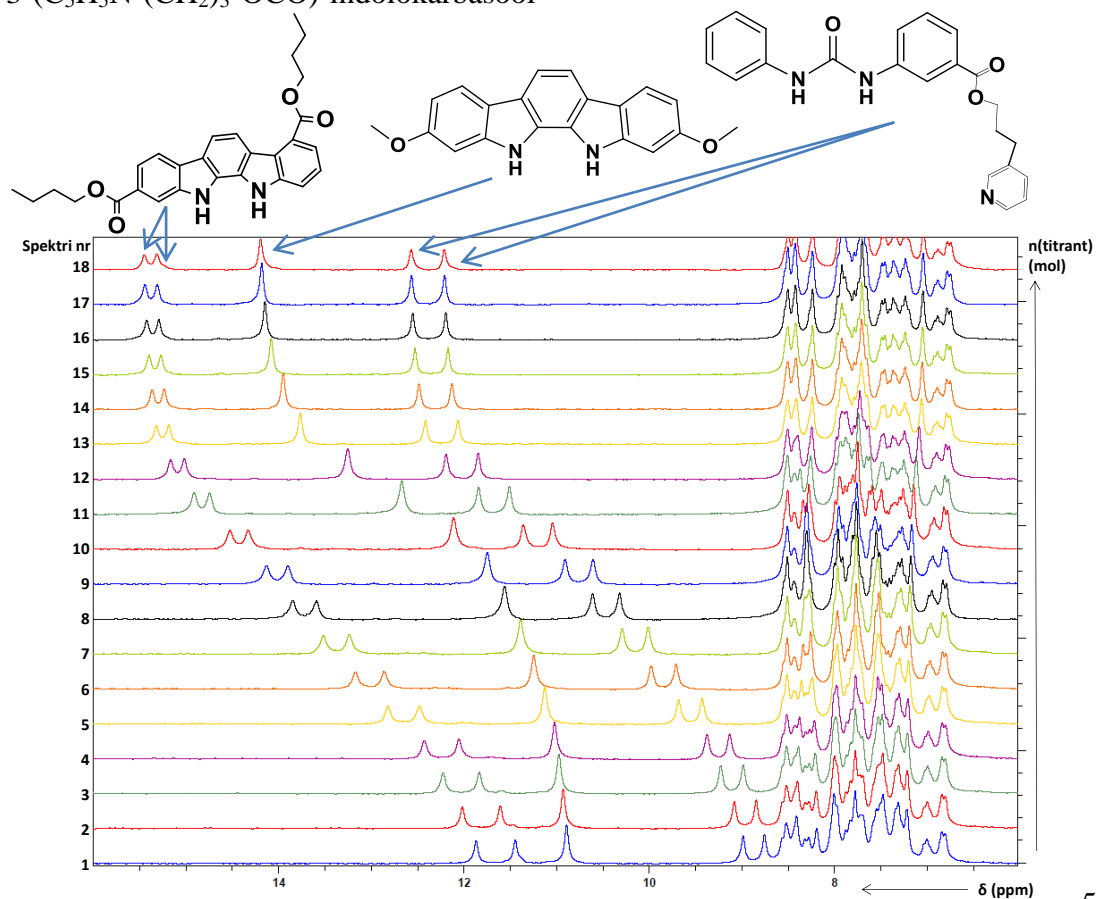


CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool; Indolokarbasool; RM-18

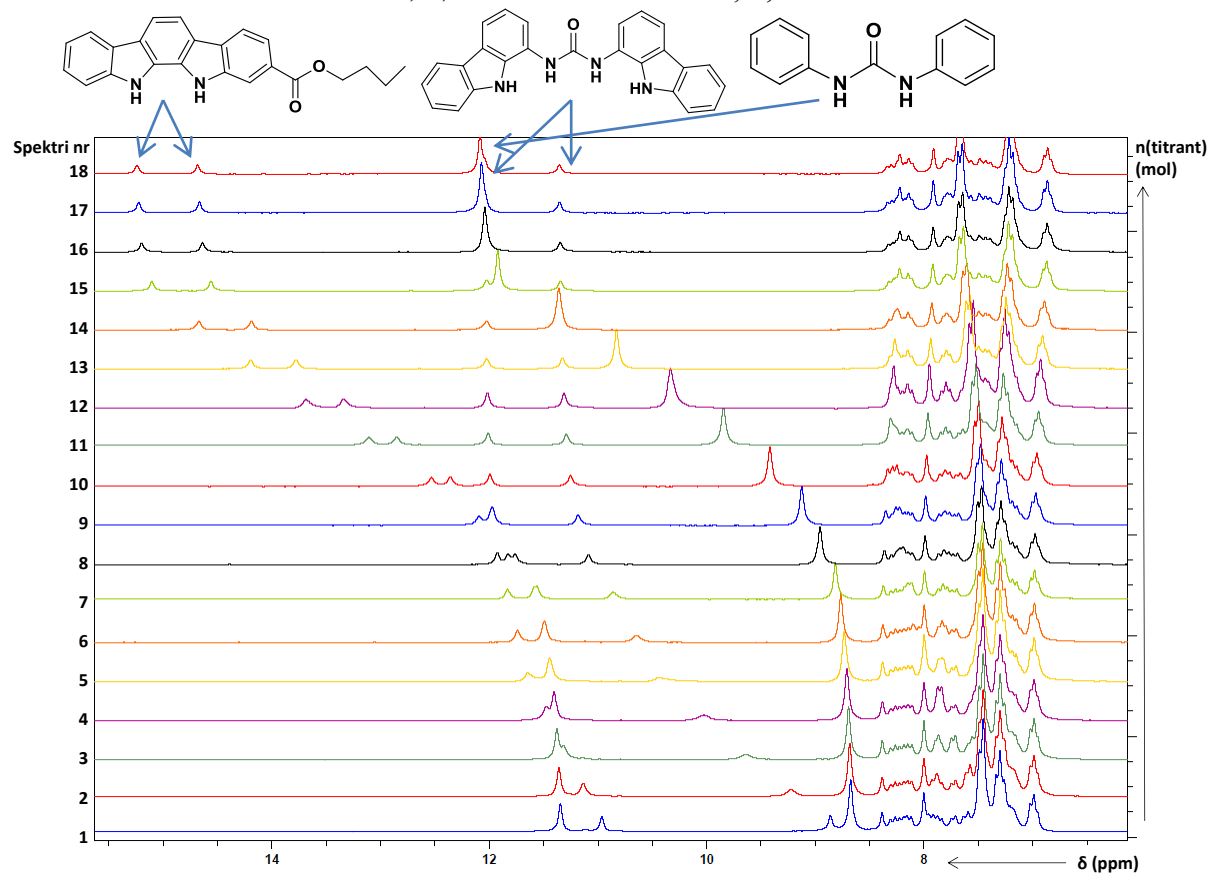


2,7-(BuOCO)₂-indolokarbasool; 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool;

3-(C₅H₅N-(CH₂)₃-OCO)-indolokarbasool

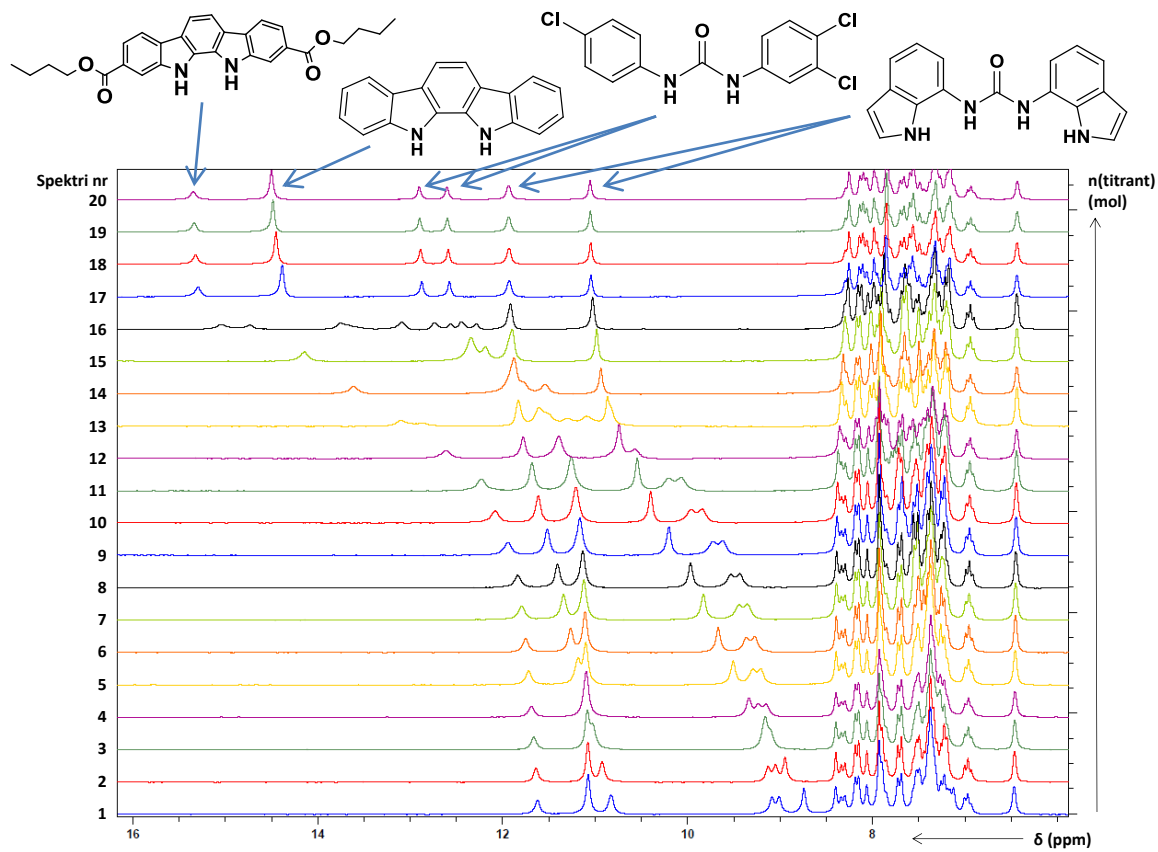


2-BuOCO-indolokarbasool; 1,3-biskarbasolüüluurea; 1,3-difenüüluurea



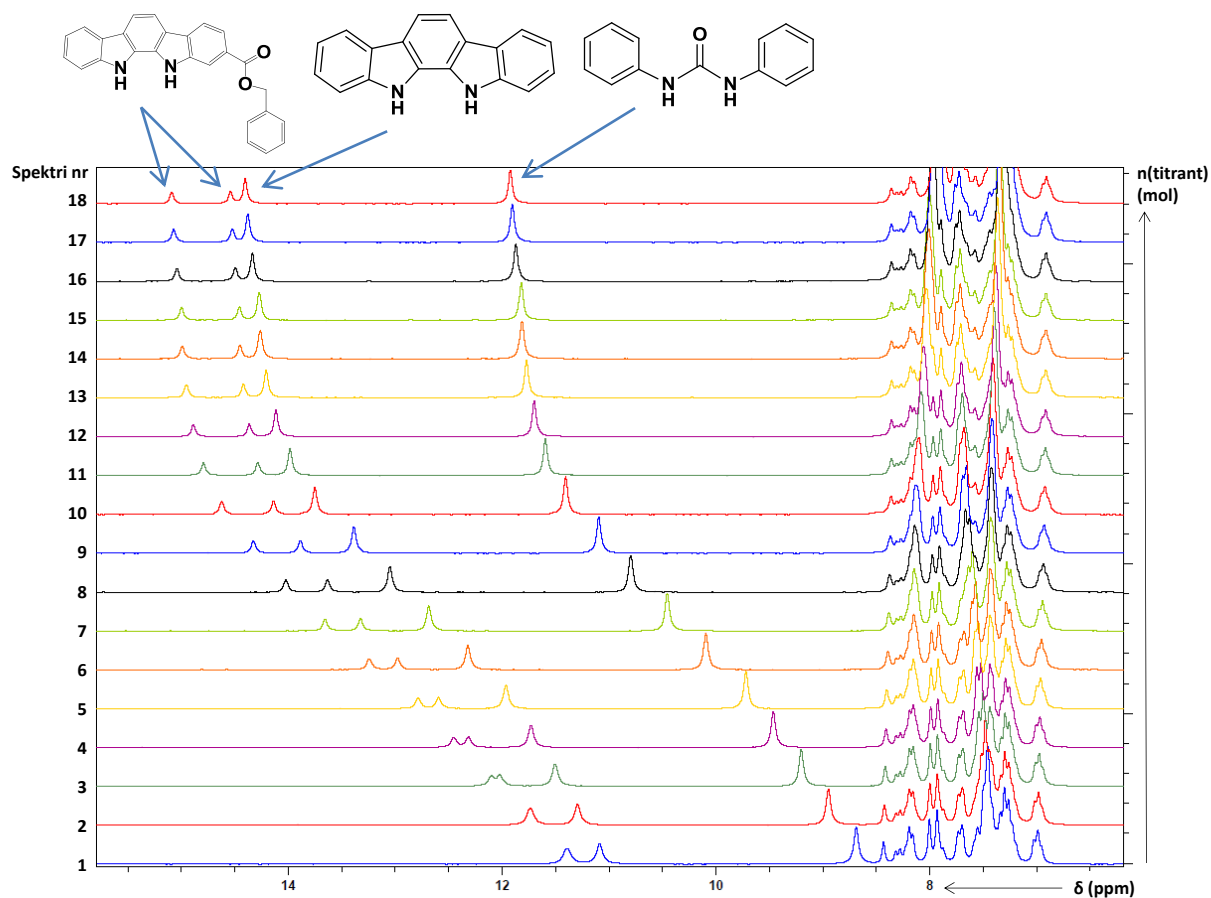
2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasool; Indolokarbasool;

3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea; 1,3-bisindolüüluurea

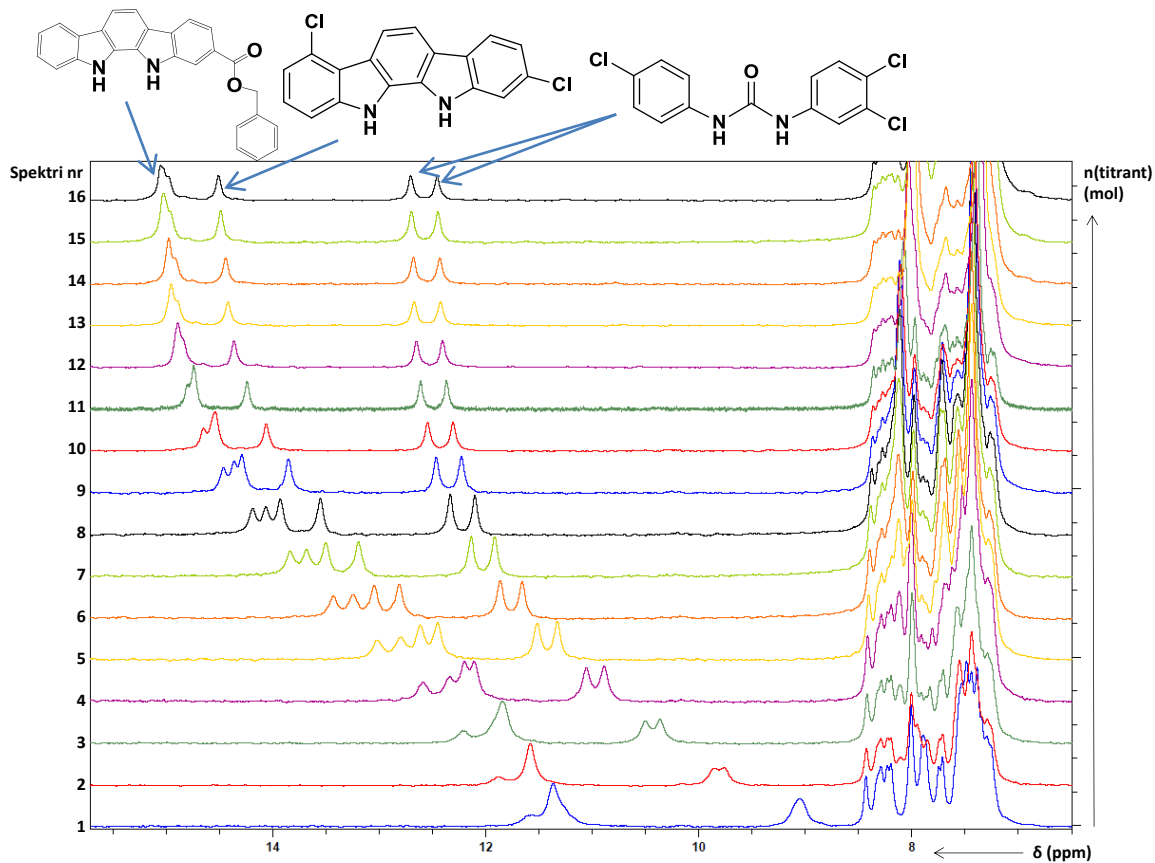


Lisa 3b. Bensoaadi TMR tiitrimise spektrid.

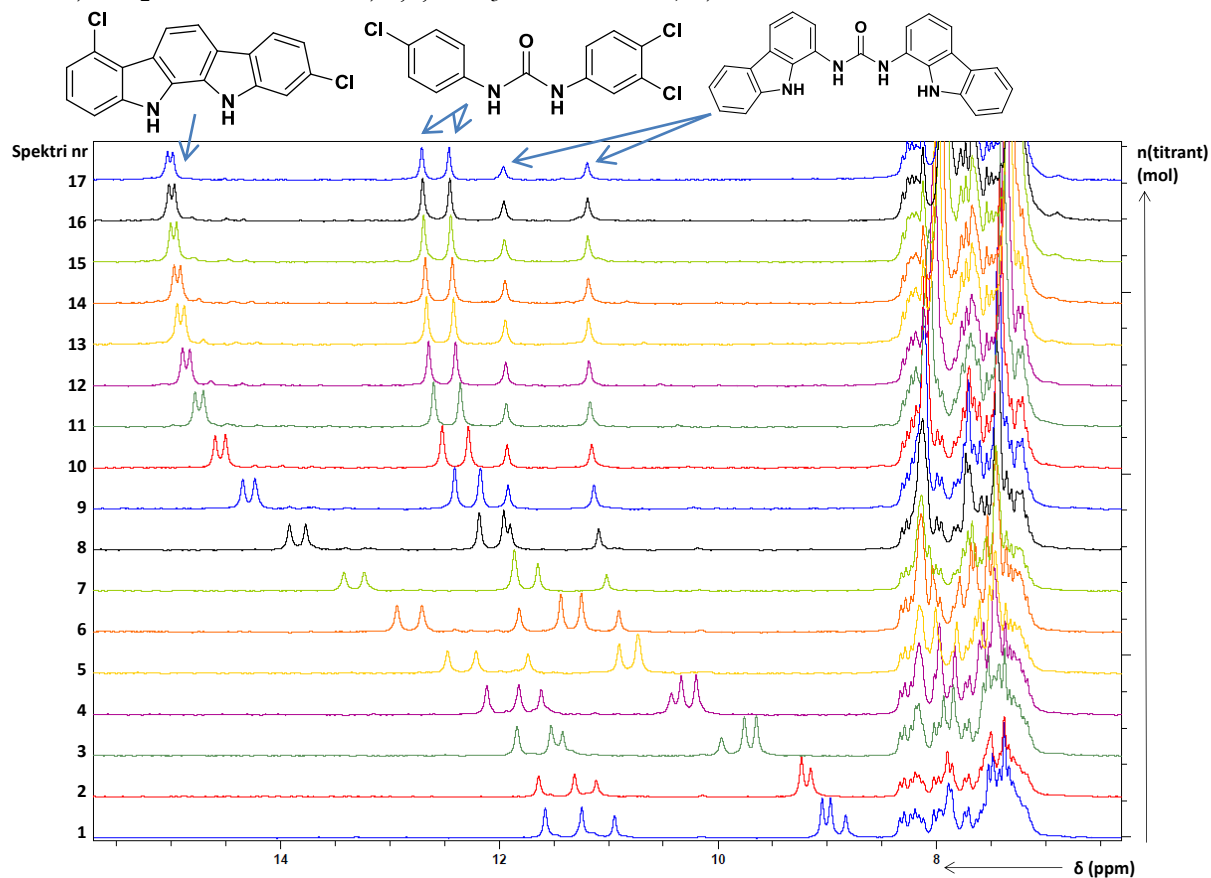
2-C₆H₅-CH₂-OCO-indolokarbasool; Indolokarbasool; 1,3-difenüüluurea



2-C₆H₅-CH₂-OCO-indolokarbasool; 2,7-Cl₂-indolokarbasool; 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea

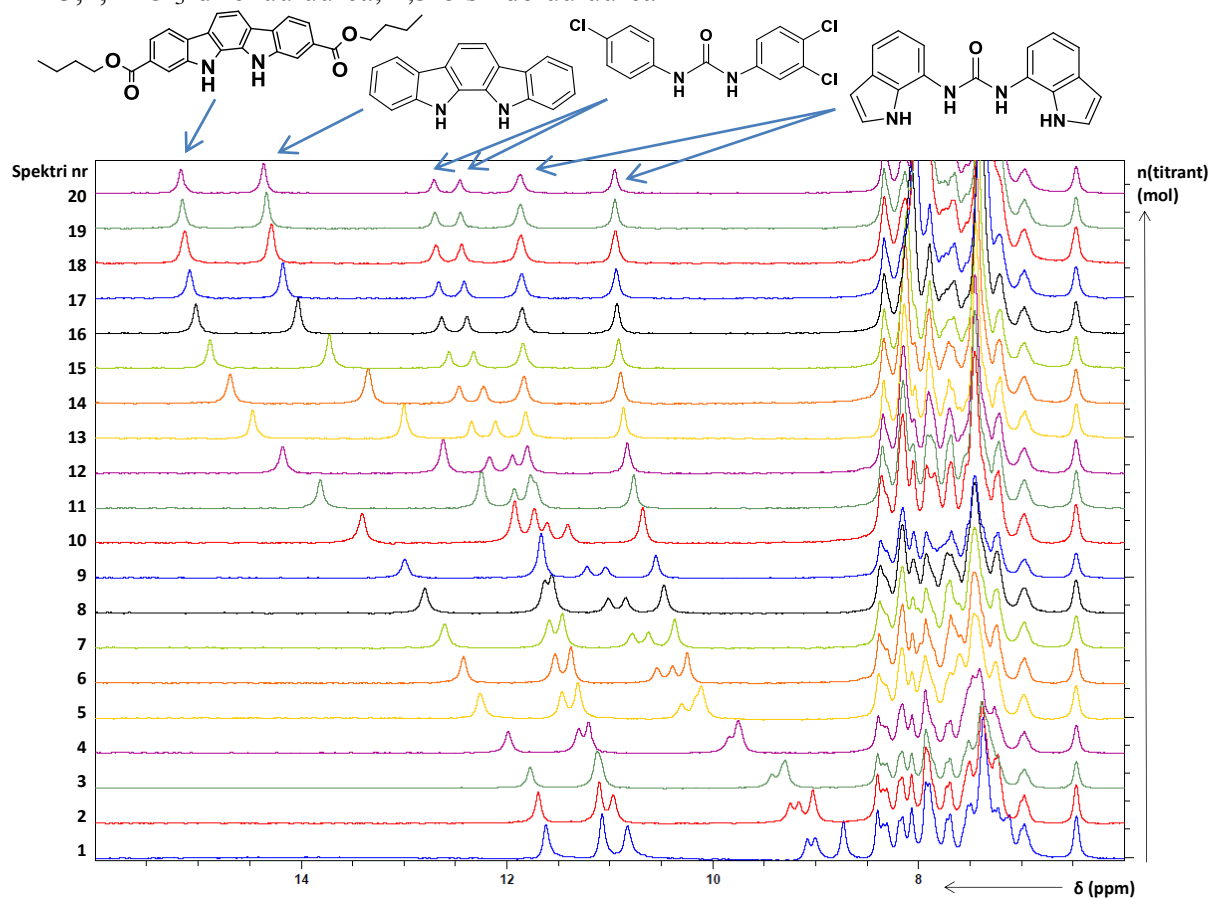


2,7-Cl₂-indolokarbasool; 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea; 1,3-biskarbasolüüluurea

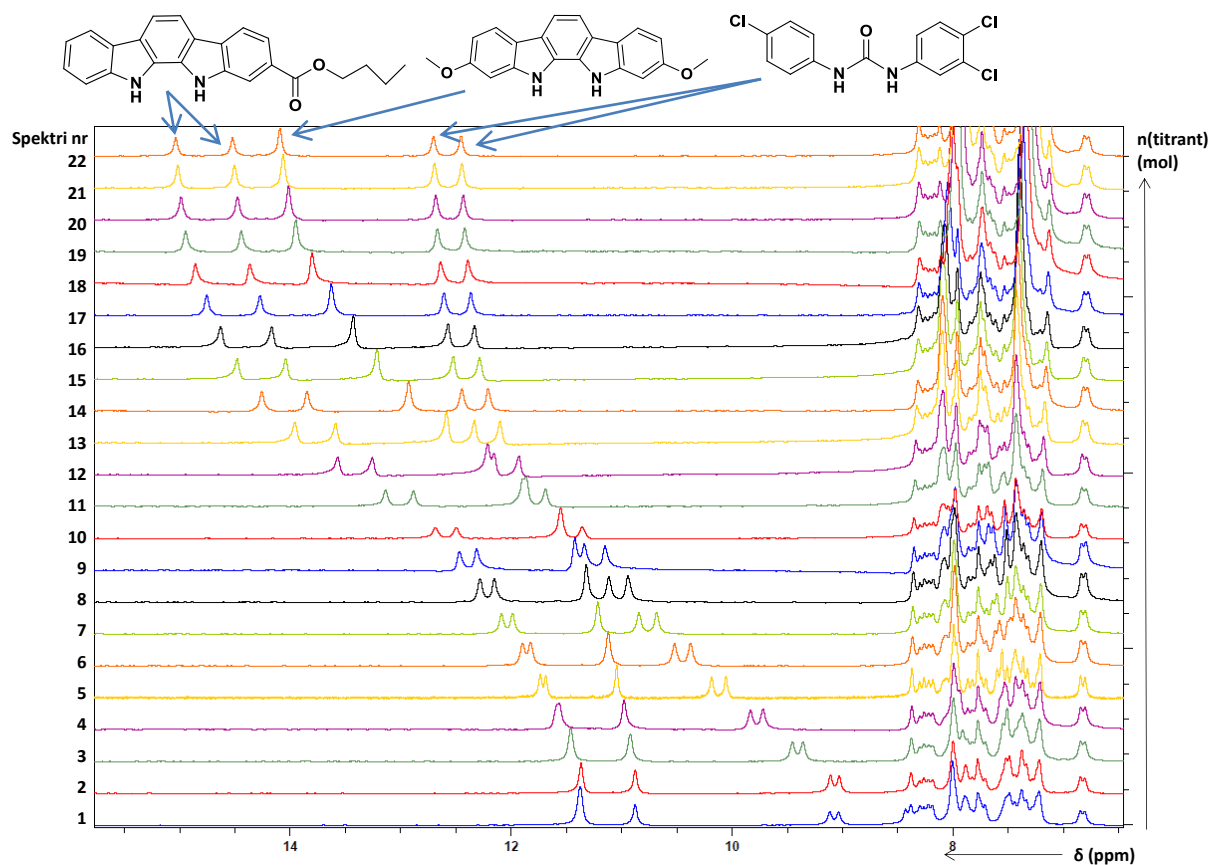


2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasool; Indolokarbasool;

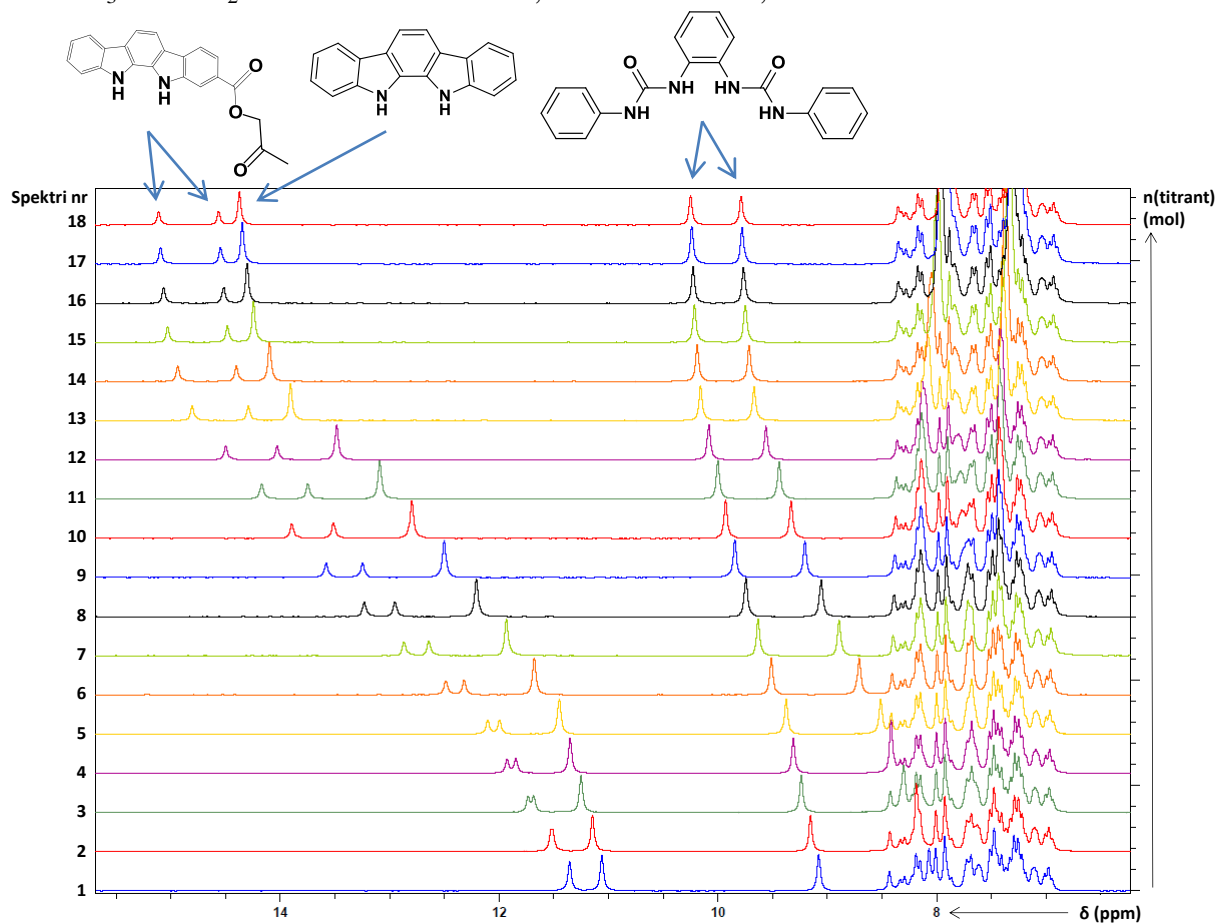
3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea; 1,3-bisindolüüluurea



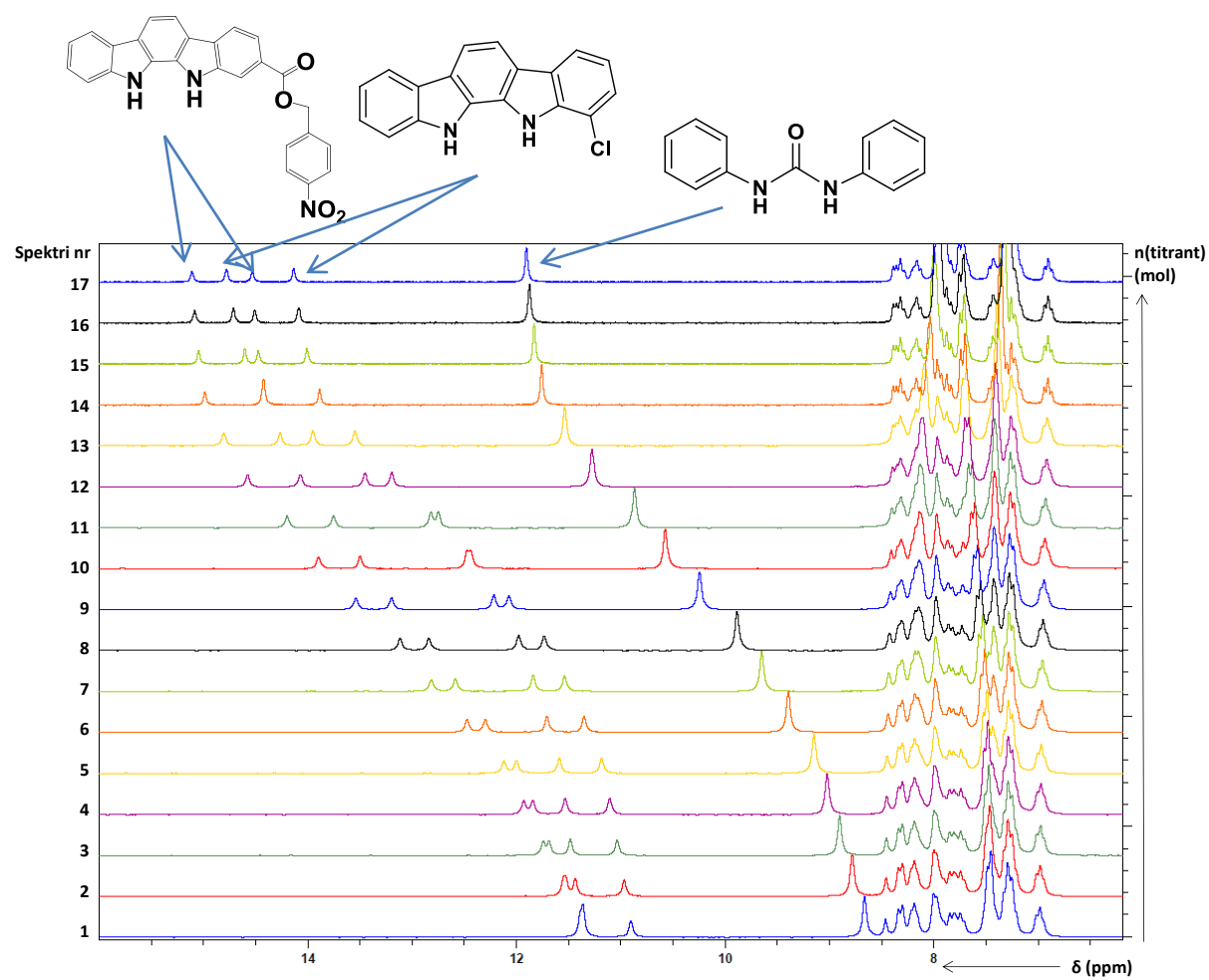
2-BuOCO-indolokarbasool; 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool; 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea



CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool; Indolokarbasool; RM-18

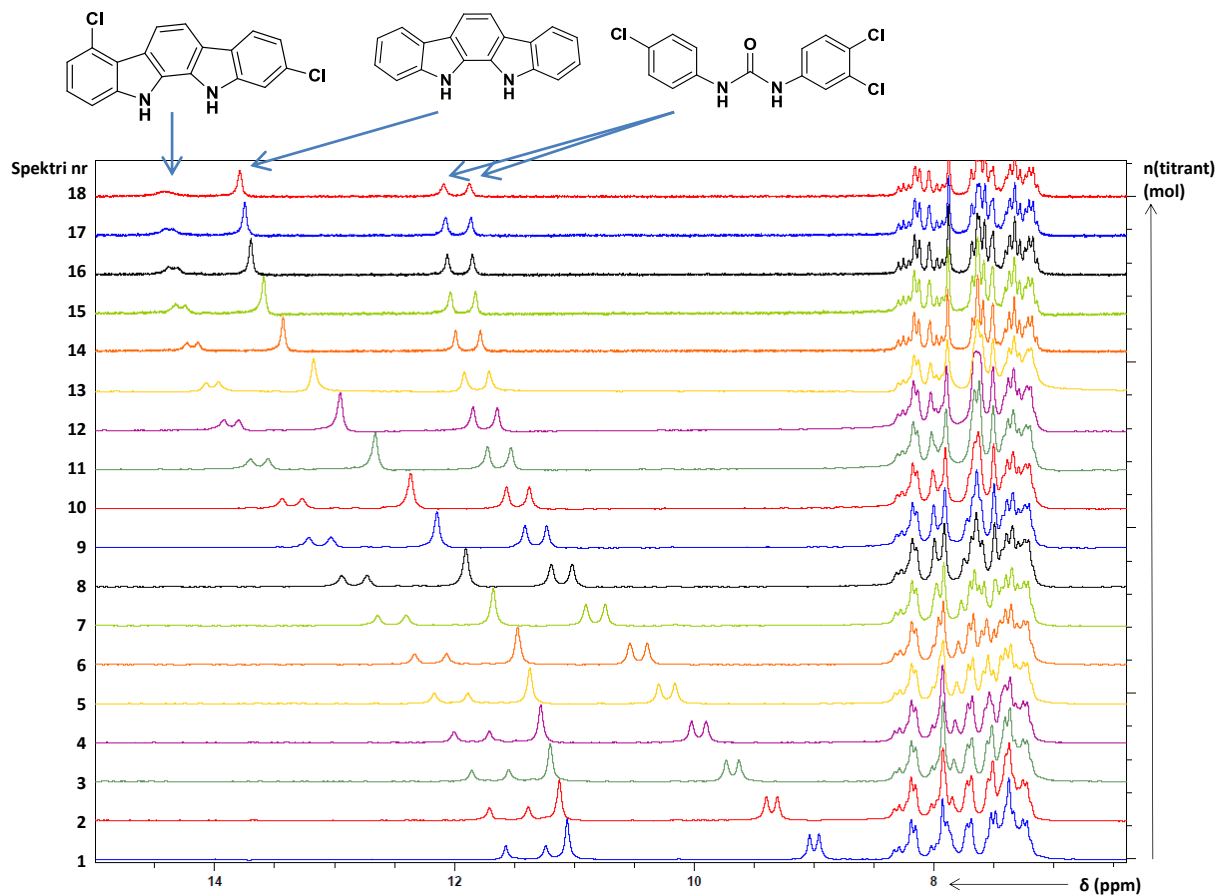


2-(4-NO₂-C₆H₄-CH₂-OCO)-indolokarbasool; 1-Cl-indolokarbasool; 1,3-difenüüluurea

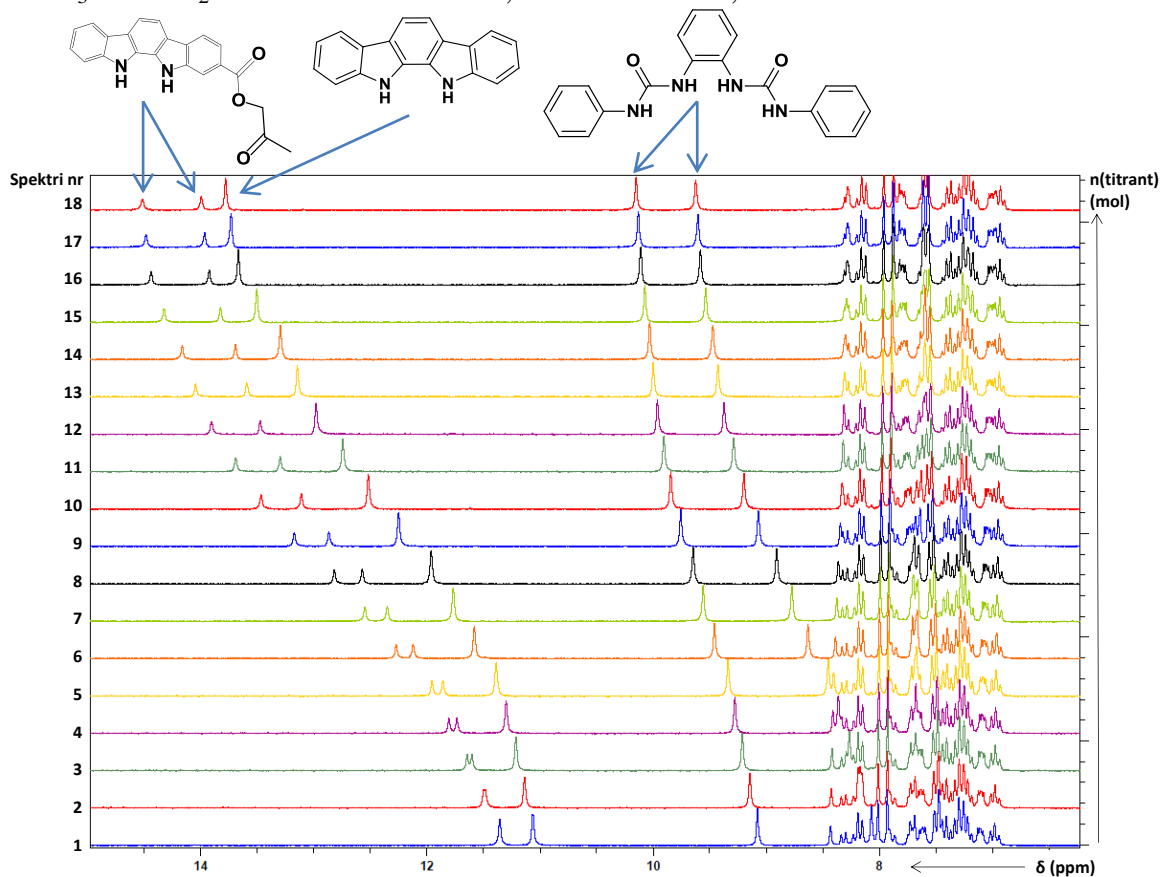


Lisa 3c. Laktaadi TMR tiitrimise spektrid.

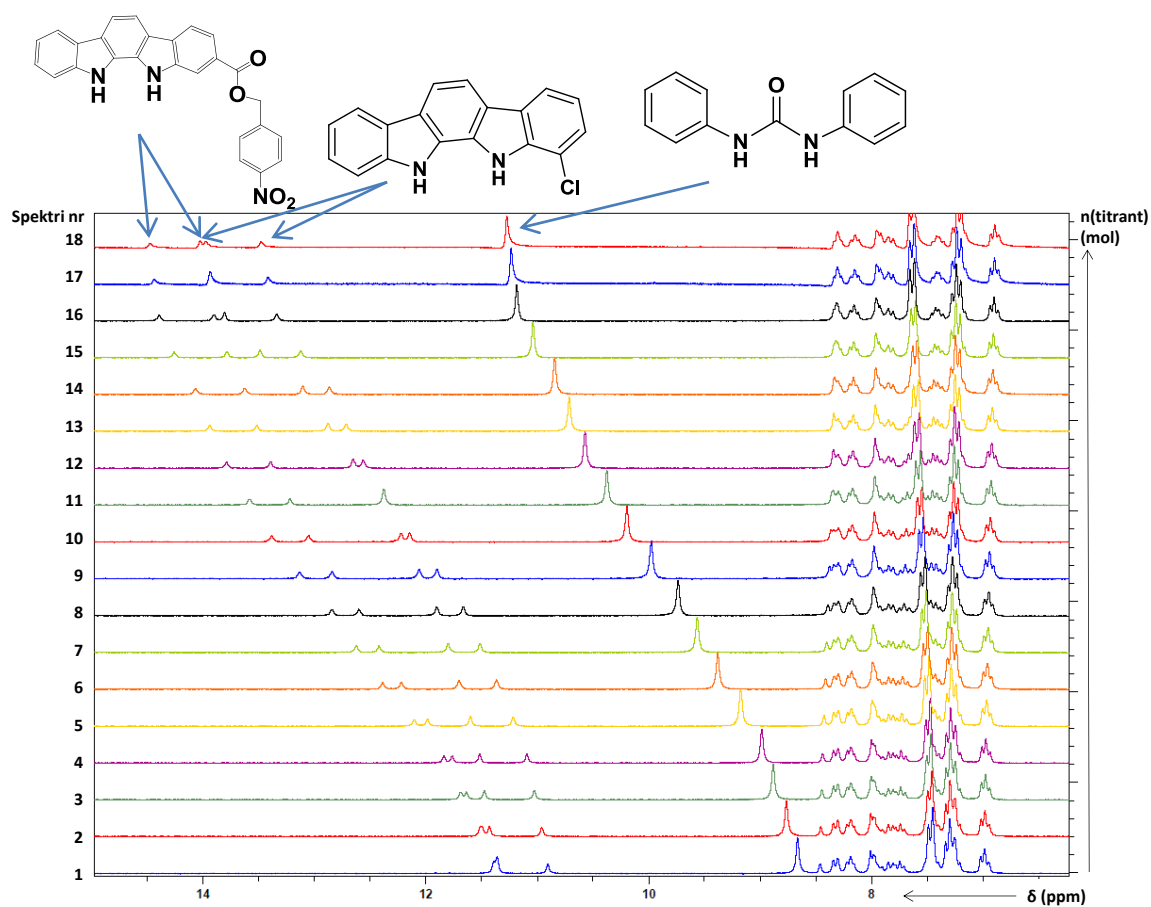
2,7-Cl₂-indolokarbasool; Indolokarbasool; 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea



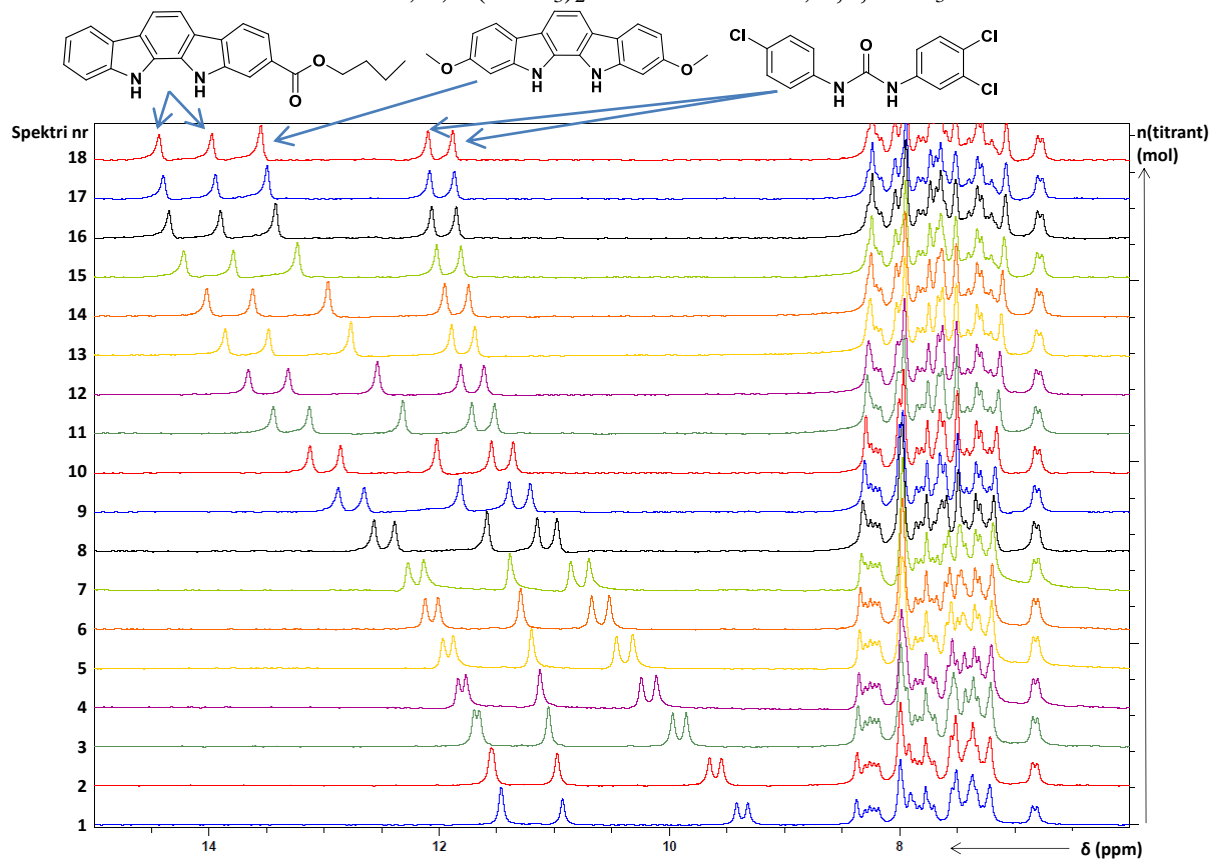
CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool; Indolokarbasool; RM-18



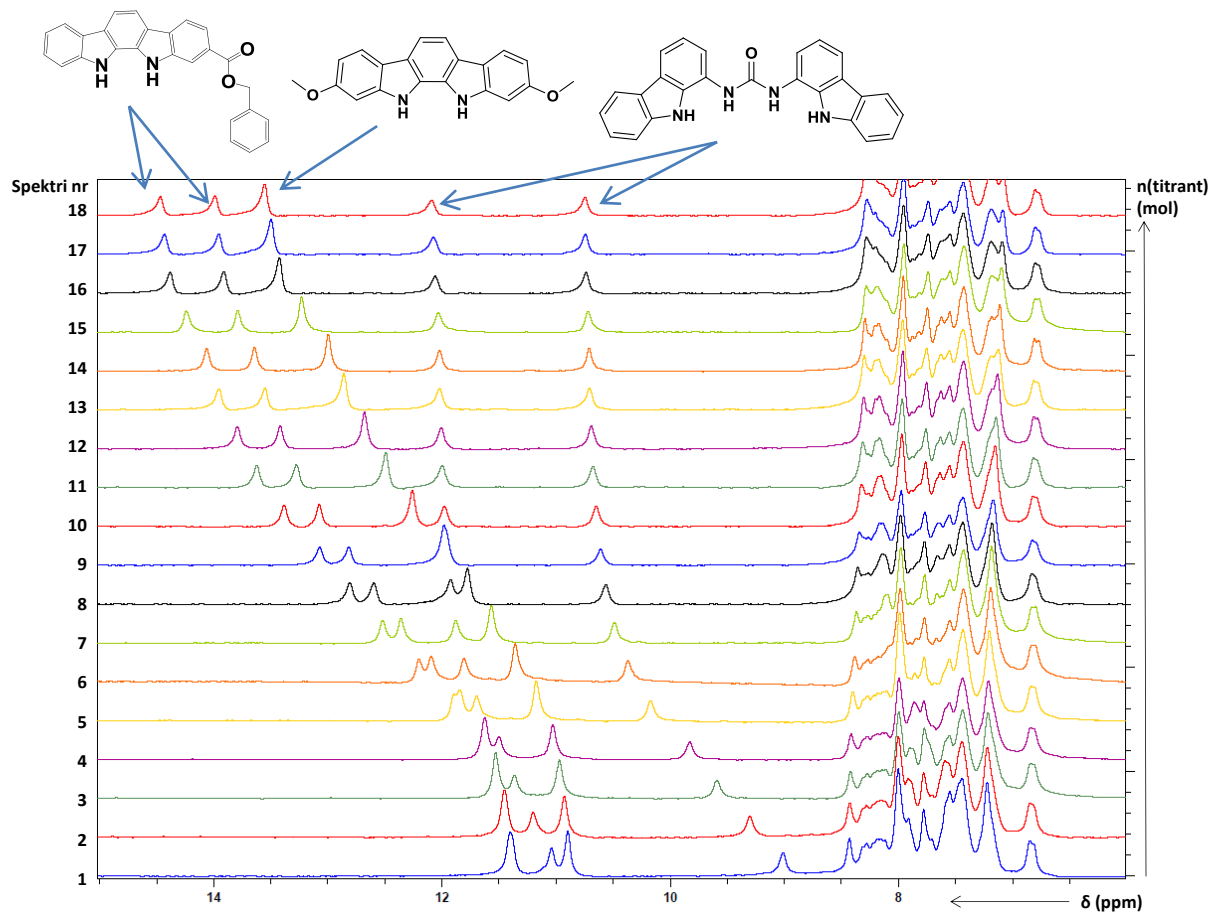
2-(4-NO₂-C₆H₄-CH₂-OCO)-indolokarbasool; 1-Cl-indolokarbasool; 1,3-difenüüluurea



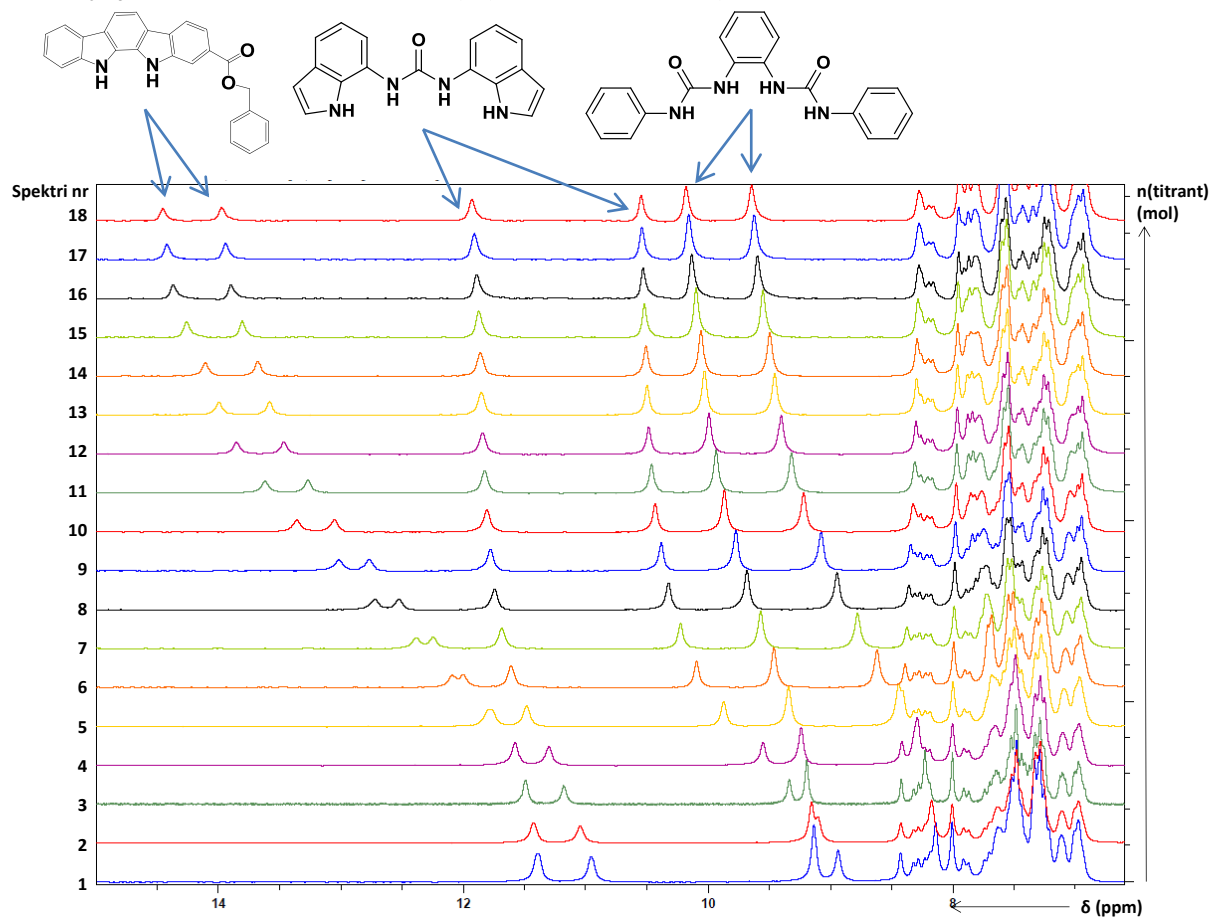
2-BuOCO-indolokarbasool; 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool; 3,4,4'-Cl₃-difenüüluurea



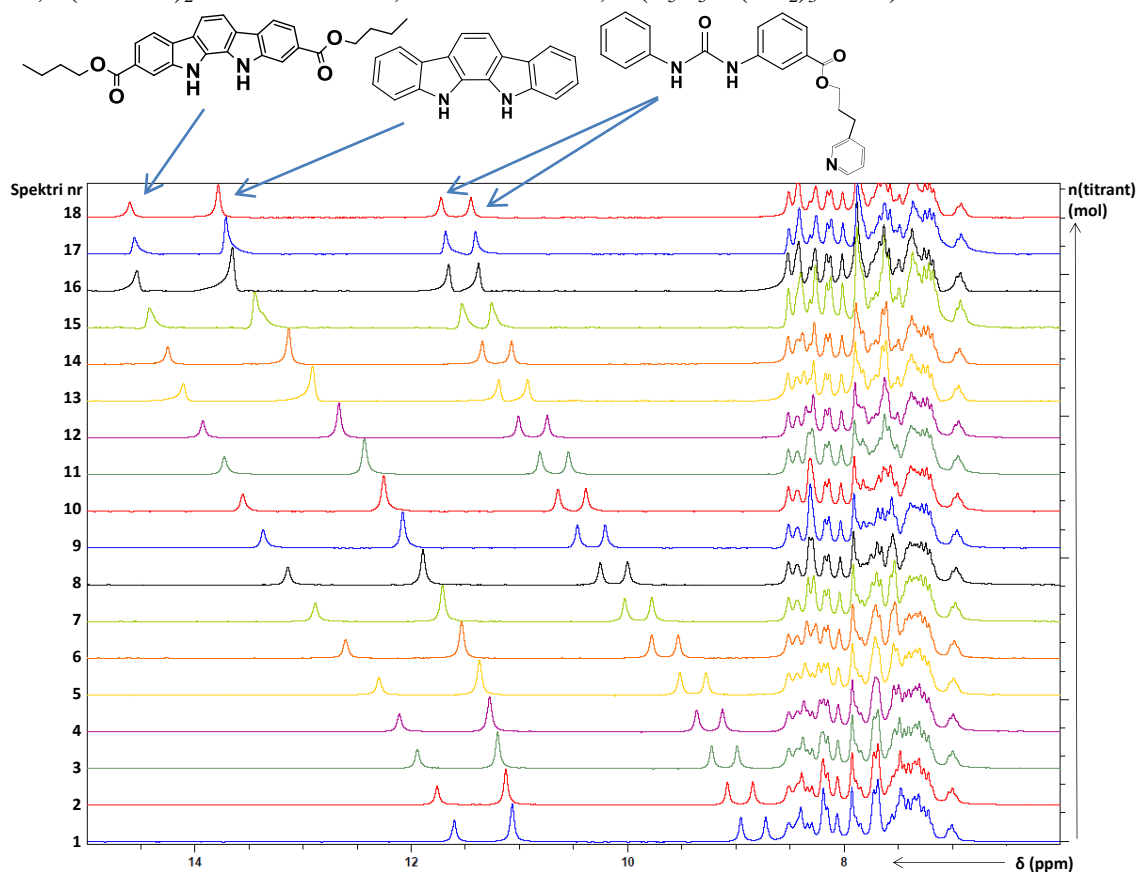
2-C₆H₅-CH₂-OCO-indolokarbasool; 2,9-(OCH₃)₂-indolokarbasool; 1,3-biskarbasolüüluurea



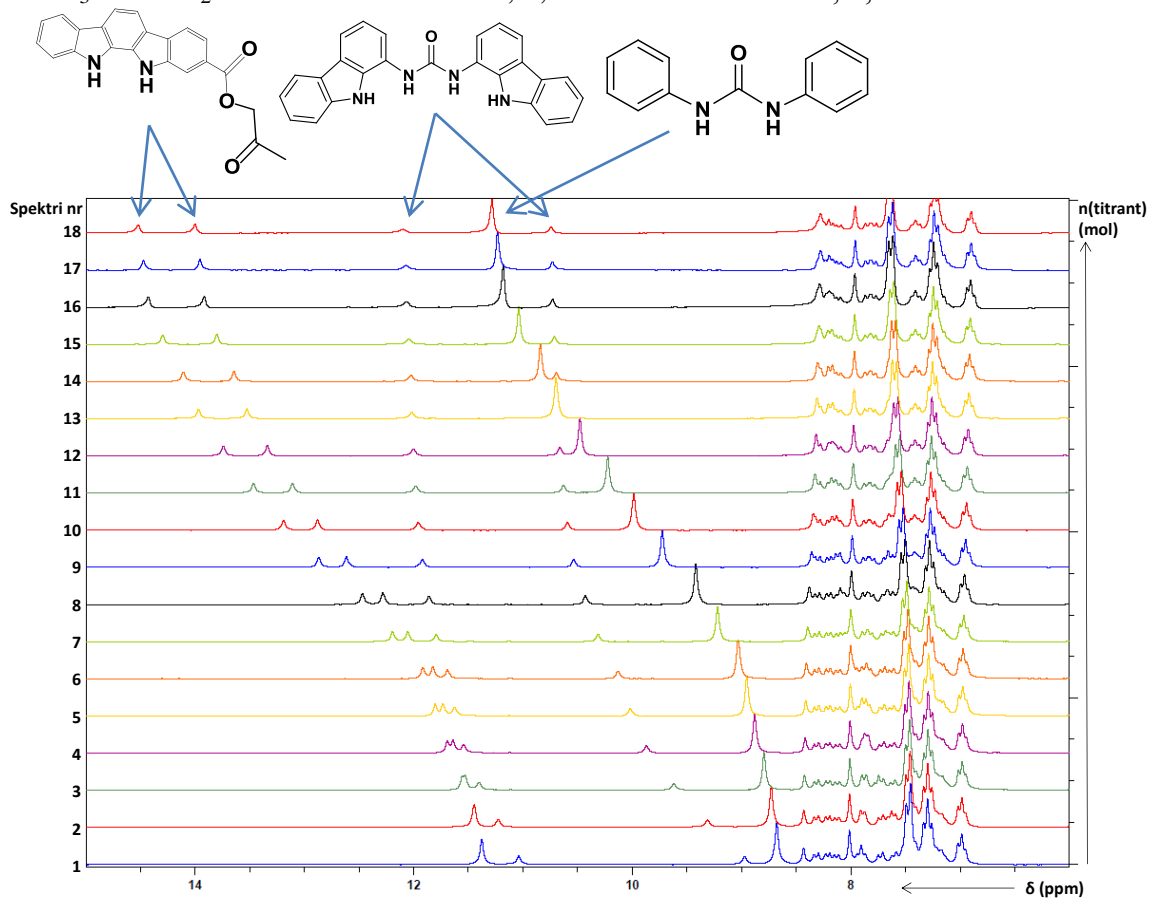
2-C₆H₅-CH₂-OCO-indolokarbasool; 1,3-bisindolüüluurea; RM-18



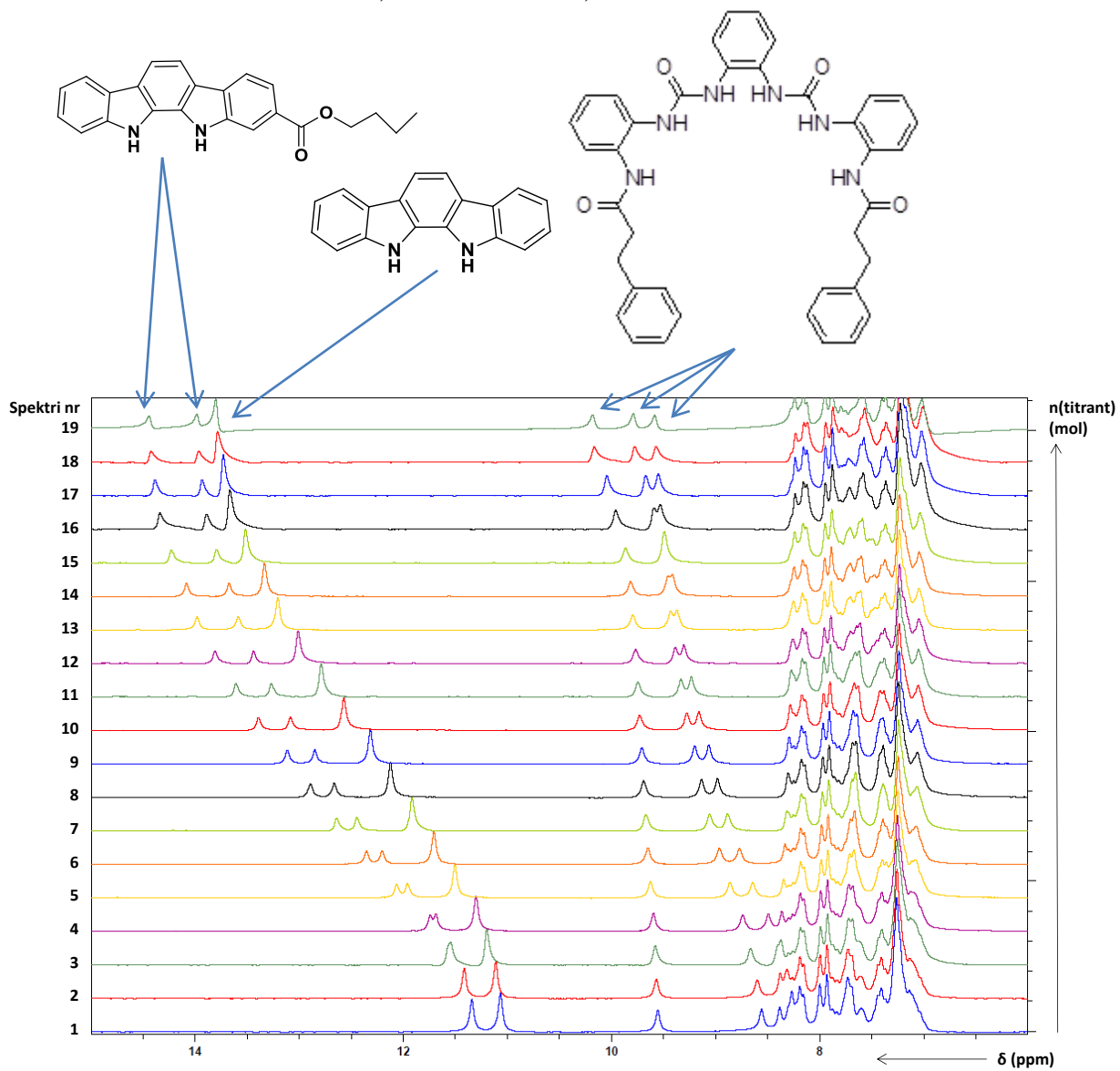
2,9-(BuOCO)₂-indolokarbasool; Indolokarbasool; 3-(C₅H₅N-(CH₂)₃-OCO)-indolokarbasool



CH₃-CO-CH₂-OCO-indolokarbasool; 1,3-biskarbasoolüluurea; 1,3-difenüüluurea



2-BuOCO-indolokarbasool; Indolokarbasool; RM-19



Litsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kerli Martin,

(sünnikuupäev 26.05.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Sünteesiliste retseptorite seondumisskaalade koostamine lihtsamatele karboksülaationidele“,

mille juhendajad on Ivo Leito ja Kristjan Haav.

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **02.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **26.05.2014**